

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 737 500

(21) N° d'enregistrement national :

95 09643

(51) Int Cl⁶ : C 12 N 7/00, 15/48, C 12 Q 1/68, C 07 H 21/00,
C 07 K 14/15, 16/10, G 01 N 33/569

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 03.08.95.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : 07.02.97 Bulletin 97/06.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : Se reporter à la fin du
présent fascicule.

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(71) Demandeur(s) : BIO MERIEUX SOCIETE ANONYME
— FR.

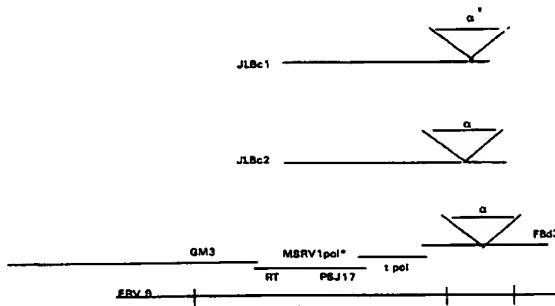
(72) Inventeur(s) : PERRON HERVE, BESEME
FREDERIC, BEDIN FREDERIC, PARANHOS
BACCALA GLAUCIA, KOMURIAN PRADEL
FLORENCE, JOLIVET REYNAUD COLETTE et
MANDRAND BERNARD.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire : GERMAIN ET MAUREAU.

(54) MATERIEL VIRAL ET FRAGMENTS NUCLEOTIDIQUES ASSOCIES A LA SCLEROSE EN PLAQUES, A DES
FINS DE DIAGNOSTIC, PROPHYLACTIQUES ET THERAPEUTIQUES.

(57) Matériel viral, à l'état isolé ou purifié, dont le génome
comprend une séquence nucléotidique choisie dans le
groupe incluant les séquences SEQ ID NO 46, SEQ ID NO
51, SEQ ID NO 52, SEQ ID NO 53 et SEQ ID NO 56, leurs
séquences complémentaires, et leurs séquences équiva-
lentes, notamment les séquences nucléotidiqes présen-
tant, pour toute suite de 100 monomères contigus, au
moins 50% et préférentiellement au moins 70% d'homolo-
gie avec respectivement lesdites séquences SEQ ID NO
46, SEQ ID NO 51, SEQ ID NO 52, SEQ ID NO 53 et SEQ
ID NO 56, et leurs séquences complémentaires.



FR 2 737 500 - A1



La Sclérose en Plaques (SEP) est une maladie démyélinisante du système nerveux central (SNC) dont la cause complète reste encore inconnue.

De nombreux travaux ont étayé l'hypothèse d'une étiologie virale de la maladie, mais aucun des virus connus testés ne s'est avéré être l'agent causal recherché: une revue des virus recherchés depuis des années dans la SEP a été faite par E. Norrby (1) et R.T. Johnson (2).

Récemment, un rétrovirus, différent des rétrovirus humains connus a été isolé chez des patients atteints de SEP (3,4 et 5). Les auteurs ont aussi pu montrer que ce rétrovirus pouvait être transmis in vitro, que des patients atteints de SEP produisaient des anticorps susceptibles de reconnaître des protéines associées à l'infection des cellules leptomeningées par ce rétrovirus, et que l'expression de ce dernier pouvait être fortement stimulée par les gènes immédiats-précoces de certains herpesvirus (6).

Tous ces résultats plaident en faveur du rôle dans la SEP d'au moins un rétrovirus inconnu ou d'un virus ayant une activité transcriptase inverse détectable selon la méthode publiée par H. Perron (3) et qualifiée d'activité "RT de type LM7". Le contenu de la publication identifiée par (3) est incorporé à la présente description, par référence.

Récemment, les travaux de la Demanderesse ont permis d'obtenir deux lignées continues de cellules infectées par des isolats naturels provenant de deux patients différents atteints de SEP, par un procédé de culture tel que décrit dans le document WO-A-9320188, dont le contenu est incorporé par référence à la présente description. Ces deux lignées dérivées de cellules de plexus-choroïdes humains, dénommées LM7PC et PLI-2 ont été déposées à l'E.C.A.C.C. respectivement le 22 juillet 1992 et le 8 janvier 1993, sous les numéros 92 072201 et

93 010817, conformément aux dispositions du Traité de Budapest. Par ailleurs, les isolats viraux possédant une activité RT de type LM7 ont également été déposés à l'E.C.A.C.C. sous la dénomination globale de "souches". La 5 "souche" ou isolat hébergé par la lignée PLI-2, dénommée POL-2, a été déposée auprès de l'E.C.A.C.C. le 22 juillet 1992 sous le n° V92072202. La "souche" ou isolat hébergé par la lignée LM7PC, dénommée MS7PG, a été déposée auprès de l'E.C.A.C.C. le 8 janvier 1993 sous le 10 n° V93010816.

A partir des cultures et des isolats précités, caractérisés par des critères biologiques et morphologiques, on s'est ensuite attaché à caractériser le matériel nucléique associé aux particules virales 15 produites dans ces cultures.

La présente demande de brevet a pour objet différents résultats, supplémentaires par rapport à ceux déjà protégés par les demandes de brevet français :

-N° 92 04322 du 03.04.1992, publiée sous le N° 2 689 519;
20 -N° 92 13447 du 03.11.1992, publiée sous le N° 2 689 521;
-N° 92 13443 du 03.11.1992, publiée sous le N° 2 689 520;
-N° 94 01529 du 04.02.1994 ;
-N° 94 01531 du 04.02.1994 ;
-N° 94 01530 du 04.02.1994 ;
25 -N° 94 01532 du 04.02.1994 ;
-N° 94 14322 du 24.11.1994 ;
-et N° 94 15810 du 23.12.1994 ;
les six dernières demandes de brevet français n'étant pas encore publiées, à la date de dépôt de la présente demande 30 de brevet.

La présente invention concerne tout d'abord un matériel viral, à l'état isolé ou purifié, pouvant être appréhendé ou caractérisé de différentes manières :
- son génome comprend une séquence nucléotidique choisie
35 dans le groupe incluant les séquences SEQ ID NO 46,
SEQ ID NO 51, SEQ ID NO 52, SEQ ID NO 53 et

SEQ ID NO 56, leurs séquences complémentaires, et leurs séquences équivalentes, notamment les séquences nucléotidiques présentant, pour toute suite de 100 monomères contigus, au moins 50 % et préférentiellement au moins 70 % d'homologie avec respectivement lesdites séquences SEQ ID NO 46, SEQ ID NO 51, SEQ ID NO 52, SEQ ID NO 53 et SEQ ID NO 56, et leurs séquences complémentaires ;

- la région de son génome comprenant les gènes env, pol et une partie du gène gag, à l'exclusion de la sous-région ayant une séquence identique ou équivalente à SEQ ID NO 1, code pour tout polypeptide présentant, pour toute suite contigue d'au moins 30 acides aminés, au moins 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec une séquence peptidique codée par toute séquence nucléotidique choisie dans le groupe incluant SEQ ID NO 46, SEQ ID NO 51, SEQ ID NO 52, SEQ ID NO 53 et SEQ ID NO 56, et leurs séquences complémentaires ;

- le gène pol comprend une séquence nucléotidique identique ou équivalente, partiellement ou totalement, à SEQ ID NO 57, à l'exclusion de SEQ ID NO 1.

La présente invention concerne également différents fragments nucléotidiques, comprenant chacun une séquence nucléotidique choisie dans le groupe incluant :

(a) toutes les séquences génomiques, partielles et totale, du gène pol du virus MSRV-1, sauf la séquence totale du fragment nucléotidique défini par SEQ ID NO 1 ;

(b) toutes les séquences génomiques, partielles et totales, du gène env de MSRV-1 ;

(c) toutes les séquences génomiques chevauchant le gène pol et le gène env du virus MSRV-1, et chevauchant le gène pol et le gène gag ;

(d) toutes les séquences, partielles et totale, d'un clone choisi dans le groupe incluant les clones FBd3 (SEQ ID NO 46), t pol (SEQ ID NO 51), JLBC1 (SEQ ID NO 52), JLBC2 (SEQ ID NO 53),

GM3 (SEQ ID NO 56), à l'exclusion de toute séquence nucléotidique identique à ou comprise dans la séquence définie par SEQ ID NO 1 ;

5 (e) les séquences complémentaires auxdites séquences génomiques ;
(f) les séquences équivalentes auxdites séquences (a) à (e), notamment les séquences nucléotidiques présentant, pour toute suite de 100 monomères contigus, au moins 50 % et de préférence au moins 70 % 10 d'homologie avec lesdites séquences (a) à (d).

Préférentiellement, un tel fragment comprend :

- ou une séquence nucléotidique identique à une séquence génomique partielle ou totale du gène pol du virus MSRV-1, sauf à la séquence totale du fragment 15 nucléotidique défini par SEQ ID NO 1, ou identique à toute séquence équivalente à ladite séquence génomique partielle ou totale, notamment homologue à cette dernière ;
- ou une séquence nucléotidique identique à une séquence 20 génomique partielle ou totale du gène env du virus MSRV-1, ou identique à toute séquence complémentaire de ladite séquence nucléotidique, ou identique à toute séquence équivalente à ladite séquence nucléotidique, notamment homologue à cette dernière.

25 De manière particulière, l'invention concerne un fragment nucléotidique comprenant une séquence nucléotidique codante, partiellement ou totalement identique à une séquence nucléotidique choisie dans le groupe incluant :

30 - la séquence nucléotidique définie par SEQ ID NO 40 ;
- les séquences complémentaires à SEQ ID NO 40 ;
- les séquences équivalentes et notamment homologues à SEQ ID NO 40 ;
- les séquences codant pour tout ou partie de la séquence 35 peptidique définie par SEQ ID NO 39 ;

-les séquences codant pour tout ou partie d'une séquence peptidique équivalente, notamment homologue à SEQ ID NO 39, susceptible d'être reconnue par des sera de patients infectés par le virus MSRV-1, ou chez lesquels 5 le virus MSRV-1 a été réactivé.

L'invention concerne aussi toute sonde nucléique de détection d'un agent pathogène et/ou infectant associé à la sclérose en plaques, susceptible de s'hybrider spécifiquement sur tout fragment tel que précédemment 10 défini, appartenant ou compris dans le génome dudit agent pathogène.

L'invention concerne aussi une amorce pour l'amplification par polymérisation d'un ARN ou d'un ADN d'un matériel viral, comprenant une séquence nucléotidique 15 identique ou équivalente à au moins une partie de la séquence nucléotidique de tout fragment tel que défini précédemment, notamment une séquence nucléotidique présentant pour toute suite de 10 monomères contigus, au moins 70 % d'homologie avec au moins ladite partie dudit 20 fragment. Préférentiellement, la séquence nucléotidique d'une telle amorce est identique à l'une quelconque des séquences choisies dans le groupe incluant SEQ ID NO 47 à SEQ ID NO 50, et SEQ ID NO 55.

De manière générale, l'invention embrasse 25 également tout ARN ou ADN, et notamment vecteur de réPLICATION, comprenant un fragment génomique du matériel viral tel que précédemment défini, ou un fragment nucléotidique tel que précédemment défini.

L'invention s'intéresse également aux différents 30 peptides codés par tout cadre de lecture ouvert appartenant à un fragment nucléotidique tel que précédemment défini, notamment tout polypeptide, par exemple tout oligopeptide formant ou comprenant un déterminant antigénique reconnu par des sera de patients 35 infectés par le virus MSRV-1, et/ou chez lesquels le virus MSRV-1 a été réactivé. Préférentiellement, ce polypeptide

est antigénique, et est codé par le cadre de lecture ouvert commençant dans le sens 5'-3', au nucléotide 181, et finissant au nucléotide 330 de SEQ ID NO 1.

A titre particulier, l'invention concerne un 5 polypeptide antigénique, reconnu par les sera de patients infectés par le virus MSRV-1, et/ou chez lesquels le virus MSRV-1 a été réactivé, dont la séquence peptidique est identique, partiellement ou totalement, ou équivalente à la séquence définie par SEQ ID NO 39 ; une telle séquence 10 est identique par exemple à toute séquence choisie dans le groupe incluant les séquences SEQ ID NO 41 à SEQ ID NO 44.

La présente invention propose également des anticorps mono- ou polyclonaux, dirigés contre le virus MSRV-1, obtenus par réaction immunologique d'un 15 organisme humain ou animal, à un agent immunogène constitué par un polypeptide antigénique tel que défini précédemment.

L'invention s'intéresse ensuite :

- aux réactifs de détection du virus MSRV-1, ou d'une 20 exposition à ce dernier, comprenant à titre de substance réactive, un peptide, notamment antigénique, tel que précédemment défini, ou un anti-ligand, notamment anticorps dudit peptide ;
- à toutes compositions diagnostiques, prophylactiques, ou 25 thérapeutiques, comprenant un ou plusieurs peptides, notamment antigéniques, tels que précédemment définis, ou un ou plusieurs anti-ligands, notamment anticorps des peptides, considérés précédemment ; une telle composition est préférentiellement, et à titre 30 d'exemple, une composition vaccinale.

L'invention s'intéresse également à toute composition diagnostique, prophylactique, ou thérapeutique, notamment pour inhiber l'expression d'au moins un agent pathogène et/ou infectant associé à la 35 sclérose en plaques, comprenant un fragment nucléotidique tel que précédemment défini, ou un polynucléotide,

notamment oligonucléotide, dont la séquence est partiellement identique à celle dudit fragment, sauf à celle du fragment ayant la séquence nucléotidique SEQ ID NO 1.

5 Selon l'invention, ces mêmes fragments, ou polynucléotides, notamment oligonucléotides, peuvent entrer dans toutes compositions appropriées, pour détecter, selon tout procédé ou méthode convenable, un agent pathologique, et/ou infectant, associé à la sclérose en plaques, dans un échantillon biologique. Dans un tel procédé, on met en contact un ARN et/ou un ADN présumé appartenir ou provenant dudit agent pathologique et/ou infectant, et/ou leur ARN et/ou ADN complémentaire, avec une telle composition.

15 La présente invention concerne également tout procédé pour détecter la présence ou l'exposition à un tel agent pathologique et/ou infectant, dans un échantillon biologique, en mettant en contact cet échantillon avec un peptide, notamment antigénique, tel que précédemment défini, ou un anti-ligand, notamment anticorps de ce peptide, tel que précédemment défini.

En pratique, et par exemple, un dispositif de détection du virus MSRV-1 comprend un réactif tel que précédemment défini, supporté par un support solide, 25 immunologiquement compatible avec le réactif, et un moyen de mise en contact de l'échantillon biologique, par exemple un échantillon de sang ou de liquide céphalo-rachidien, susceptible de contenir des anticorps anti-MSRV-1, avec ce réactif, dans des conditions 30 permettant une éventuelle réaction immunologique, tout ceci avec des moyens de détection du complexe immun formé avec ce réactif.

Pour terminer, l'invention concerne également la détection d'anticorps anti-MSRV-1, dans un échantillon 35 biologique, par exemple un échantillon de sang ou de liquide céphalo-rachidien, selon lequel on met en contact

cet échantillon avec un réactif tel que précédemment défini, consistant en un anticorps, dans des conditions permettant leur éventuelle réaction immunologique, et on détecte ensuite la présence du complexe immun ainsi formé 5 avec le réactif.

Avant de détailler l'invention, différents termes utilisés dans la description et les revendications sont à présent définis :

- par souche ou isolat, on entend toute fraction 10 biologique infectante et/ou pathogène, contenant par exemple des virus et/ou des bactéries et/ou des parasites, générant un pouvoir pathogène et/ou antigénique, hébergée par une culture ou un hôte vivant ; à titre d'exemple, une souche virale selon la définition précédente peut contenir 15 un agent co-infectant, par exemple un protiste pathogène,

- le terme "MSRV" utilisé dans la présente description désigne tout agent pathogène et/ou infectant, associé à la sclérose en plaques, notamment une espèce virale, les souches atténuées de ladite espèce virale, ou 20 les particules défectives interférentes dérivées de cette espèce. Il est connu que les virus et particulièrement les virus contenant de l'ARN ont une variabilité, consécutive notamment à des taux relativement élevés de mutation spontanée (7), dont il sera tenu compte ci-après pour 25 définir la notion d'équivalence,

- par virus humain, on entend un virus susceptible d'infecter l'être humain,

- compte tenu de toutes les variations naturelles ou induites, pouvant être rencontrées dans la pratique de 30 la présente invention, les objets de cette dernière, définis ci-dessus et dans les revendications, ont été exprimés en comprenant les équivalents ou dérivés des différents matériels biologiques définis ci-après, notamment des séquences homologues nucléotidiques ou 35 peptidiques,

- le variant d'un virus ou d'un agent pathogène et/ou infectant selon l'invention, comprend au moins un antigène reconnu par au moins un anticorps dirigé contre au moins un antigène correspondant dudit virus et/ou dudit agent pathogène et/ou infectant, et/ou un génome dont toute partie est détectée par au moins une sonde d'hybridation, et/ou au moins une amorce d'amplification nucléotidique spécifique dudit virus et/ou agent pathogène et/ou infectant, comme par exemple pour le virus dit MSRV-1, celles ayant une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N° 20 à SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 16 à SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 31 à SEQ ID N° 33, SEQ ID N° 45, SEQ ID N° 47, SEQ ID N° 48, SEQ ID N° 49, SEQ ID N° 50, SEQ ID N° 45 et leurs séquences complémentaires, dans des conditions d'hybridation déterminées bien connues de l'homme de l'art,

- selon l'invention, un fragment nucléotidique ou un oligonucléotide ou un polynucléotide est un enchaînement de monomères, ou un biopolymère, caractérisé par la séquence informationnelle des acides nucléiques naturels, susceptible de s'hybrider à tout autre fragment nucléotidique dans des conditions prédéterminées, l'enchaînement pouvant contenir des monomères de structures chimiques différentes et être obtenu à partir d'une molécule d'acide nucléique naturelle et/ou par recombinaison génétique et/ou par synthèse chimique ; un fragment nucléotidique peut être identique à un fragment génomique du virus MSRV-1 considéré par la présente invention, notamment un gène de ce dernier, par exemple pol ou env dans le cas dudit virus ;

- ainsi un monomère peut être un nucléotide naturel d'acide nucléique, dont les éléments constitutifs sont un sucre, un groupement phosphate et une base azotée; dans l'ARN le sucre est le ribose, dans l'ADN le sucre est le désoxy-2-ribose; selon qu'il s'agit de l'ADN ou l'ARN, la base azotée est choisie parmi l'adénine, la guanine,

l'uracile, la cytosine, la thymine; ou le nucléotide peut être modifié dans l'un au moins des trois éléments constitutifs ; à titre d'exemple, la modification peut intervenir au niveau des bases, générant des bases 5 modifiées telles que l'inosine, la méthyl-5-désoxycytidine, la désoxyuridine, la diméthylamino-5-désoxyuridine, la diamino-2,6-purine, la bromo-5-désoxyuridine et toute autre base modifiée favorisant l'hybridation; au niveau du sucre, la 10 modification peut consister dans le remplacement d'au moins un désoxyribose par un polyamide (8), et au niveau du groupement phosphate, la modification peut consister dans son remplacement par des esters, notamment choisis 15 parmi les esters de diphosphate, d'alkyl et arylphosphonate et de phosphorothioate,

- par "séquence informationnelle", on entend toute suite ordonnée de monomères, dont la nature chimique et l'ordre dans un sens de référence, constituent ou non une information fonctionnelle de même qualité que celle 20 des acides nucléiques naturels,

- par hybridation, on entend le processus au cours duquel, dans des conditions opératoires appropriées, deux fragments nucléotidiques, ayant des séquences suffisamment complémentaires, s'apparent pour former une 25 structure complexe, notamment double ou triple, de préférence sous forme d'hélice,

- une sonde comprend un fragment nucléotidique synthétisé par voie chimique ou obtenu par digestion ou coupure enzymatique d'un fragment nucléotidique plus long, 30 comprenant au moins six monomères, avantageusement de 10 à 100 monomères, de préférence 10 à 30 monomères, et possédant une spécificité d'hybridation dans des conditions déterminées ; de préférence, une sonde possédant moins de 10 monomères n'est pas utilisée seule, 35 mais l'est en présence d'autres sondes de taille aussi courte ou non ; dans certaines conditions particulières,

il peut être utile d'utiliser des sondes de taille supérieure à 100 monomères ; une sonde peut notamment être utilisée à des fins de diagnostic et il s'agira par exemple de sondes de capture et/ou de détection,

5 - la sonde de capture peut être immobilisée sur un support solide par tout moyen approprié, c'est-à-dire directement ou indirectement, par exemple par covalence ou adsorption passive,

10 10 moyen d'un marqueur choisi notamment parmi les isotopes radioactifs, des enzymes notamment choisis parmi la peroxydase et la phosphatase alcaline et ceux susceptibles d'hydrolyser un substrat chromogène, fluorogène ou luminescent, des composés chimiques chromophores, des 15 15 composés chromogènes, fluorogènes ou luminescents, des analogues de bases nucléotidiques, et la biotine,

- les sondes utilisées à des fins de diagnostic de l'invention peuvent être mises en oeuvre dans toutes les techniques d'hybridation connues, et notamment les 20 20 techniques dites "DOT-BLOT" (9), "SOUTHERN BLOT" (10), "NORTHERN BLOT" qui est une technique identique à la technique "SOUTHERN BLOT" mais qui utilise de l'ARN comme cible, la technique SANDWICH (11) ; avantageusement, on utilise la technique SANDWICH dans la présente invention, 25 25 comprenant une sonde de capture spécifique et/ou une sonde de détection spécifique, étant entendu que la sonde de capture et la sonde de détection doivent présenter une séquence nucléotidique au moins partiellement différente,

- toute sonde selon la présente invention peut 30 30 s'hybrider in vivo ou in vitro sur l'ARN et/ou sur l'ADN, pour bloquer les phénomènes de réPLICATION, notamment traduction et/ou transcription, et/ou pour dégrader ledit ADN et/ou ARN,

- une amorce est une sonde comprenant au moins 35 35 six monomères, et avantageusement de 10 à 30 monomères, possédant une spécificité d'hybridation dans des

conditions déterminées, pour l'initiation d'une polymérisation enzymatique, par exemple dans une technique d'amplification telle que la PCR (Polymerase Chain Reaction), dans un procédé d'elongation, tel que le 5 séquençage, dans une méthode de transcription inverse ou analogue,

- deux séquences nucléotidiques ou peptidiques sont dites équivalentes ou dérivées l'une par rapport à l'autre, ou par rapport à une séquence de référence, si 10 fonctionnellement les biopolymères correspondants peuvent jouer sensiblement le même rôle, sans être identiques, vis-à-vis de l'application ou utilisation considérée, ou dans la technique dans laquelle elles interviennent ; sont notamment équivalentes deux séquences obtenues du fait de 15 la variabilité naturelle, notamment mutation spontanée de l'espèce à partir de laquelle elles ont été identifiées, ou induite, ainsi que deux séquences homologues, l'homologie étant définie ci-après,

- par "variabilité", on entend toute 20 modification, spontanée ou induite d'une séquence, notamment par substitution, et/ou insertion, et/ou délétion de nucléotides et/ou de fragments nucléotidiques, et/ou extension et/ou racourcissement de la séquence à l'une au moins des extrémités ; une variabilité non 25 naturelle peut résulter des techniques de génie génétique utilisées, par exemple du choix des amorces de synthèse dégénérées ou non, retenues pour amplifier un acide nucléique; cette variabilité peut se traduire par des modifications de toute séquence de départ, considérée 30 comme référence, et pouvant être exprimées par un degré d'homologie par rapport à ladite séquence de référence,

- l'homologie caractérise le degré d'identité de 35 deux fragments nucléotidiques ou peptidiques comparés ; elle se mesure par le pourcentage d'identité qui est notamment déterminé par comparaison directe de séquences

nucléoditiques ou peptidiques, par rapport à des séquences nucléotidiques ou peptidiques de référence,

- ce pourcentage d'identité a été spécifiquement déterminé pour les fragments nucléotidiques notamment 5 clones relevant de la présente invention, homologues aux fragments identifiés pour le virus MSRV-1 par SEQ ID N° 1 à N° 9, SEQ ID NO 46, SEQ ID NO 51 à SEQ ID NO 53, SEQ ID NO 40, SEQ ID NO 56 et SEQ ID NO 57, ainsi que pour les sondes et amorces homologues aux sondes et amorces 10 identifiées par SEQ ID NO 20 à SEQ ID NO 24, SEQ ID NO 26, SEQ ID NO 16 à SEQ ID NO 19, SEQ ID NO 31 à SEQ ID NO 33, SEQ ID NO 45, SEQ ID NO 47, SEQ ID NO 48, SEQ ID NO 49, SEQ ID NO 50, SEQ ID NO 55, SEQ ID NO 40, SEQ ID NO 56 et SEQ ID NO 57 ; à titre d'exemple, le plus faible 15 pourcentage d'identité observé entre les différents consensus généraux en acides nucléiques obtenus à partir de fragments d'ARN viral de MSRV-1, issu des lignées LM7PC et PLI-2 selon un protocole détaillé plus loin, est de 67% dans la région décrite à la figure 1,

20 - tout fragment nucléotidique est dit équivalent ou dérivé d'un fragment de référence, s'il présente une séquence nucléotidique équivalente à la séquence du fragment de référence ; selon la définition précédente, sont notamment équivalents à un fragment nucléotidique de 25 référence :

(a) tout fragment susceptible de s'hybrider au moins partiellement avec le complément du fragment de référence,

30 (b) tout fragment dont l'alignement avec le fragment de référence conduit à mettre en évidence des bases contigues identiques, en nombre plus important qu'avec tout autre fragment provenant d'un autre groupe taxonomique,

35 (c) tout fragment résultant ou pouvant résulter de la variabilité naturelle de l'espèce, à partir de laquelle il est obtenu,

(d) tout fragment pouvant résulter des techniques de génie génétique appliquées au fragment de référence,

5 (e) tout fragment, comportant au moins huit nucléotides contigus, codant un peptide homologue ou identique au peptide codé par le fragment de référence,

(f) tout fragment différent du fragment de référence, par insertion, délétion, substitution d'au moins un monomère, extension, ou raccourcissement à l'une au moins de ses extrémités ; par exemple, tout fragment 10 correspondant au fragment de référence, flanqué à l'une au moins de ses extrémités par une séquence nucléotidique ne codant pas pour un polypeptide,

- par polypeptide, on entend notamment tout peptide d'au moins deux acides aminés, notamment 15 oligopeptide, protéine, extrait, séparé, ou substantiellement isolé ou synthétisé, par l'intervention de la main de l'homme, notamment ceux obtenus par synthèse chimique, ou par expression dans un organisme recombinant,

- par polypeptide codé de manière partielle par 20 un fragment nucléotidique, on entend un polypeptide présentant au moins trois acides aminés codés par au moins neuf monomères contigus compris dans ledit fragment nucléotidique,

- un acide aminé est dit analogue à un autre 25 acide aminé, lorsque leur caractéristiques physico-chimiques respectives, telles que polarité, hydrophobicité, et/ou basicité, et/ou acidité, et/ou neutralité, sont sensiblement les mêmes ; ainsi, une leucine est analogue à une isoleucine.

30 - tout polypeptide est dit équivalent ou dérivé d'un polypeptide de référence, si les polypeptides comparés ont sensiblement les mêmes propriétés, et notamment les mêmes propriétés antigéniques, immunologiques, enzymologiques et/ou de reconnaissance 35 moléculaire ; est notamment équivalent à un polypeptide de référence :

(a) tout polypeptide possédant une séquence dont au moins un acide aminé a été substitué par un acide aminé analogue,

5 (b) tout polypeptide ayant une séquence peptidique équivalente, obtenue par variation naturelle ou induite dudit polypeptide de référence, et/ou du fragment nucléotidique codant pour ledit polypeptide,

(c) un mimotope dudit polypeptide de référence,

10 (d) tout polypeptide dans la séquence duquel un ou plusieurs acides aminés de la série L sont remplacés par un acide aminé de la série D, et vice versa,

15 (e) tout polypeptide dans la séquence duquel on a introduit une modification des chaînes latérales des acides aminés, telle que par exemple une acétylation des fonctions amines, une carboxylation des fonctions thiol, une estérification des fonctions carboxyliques,

20 (f) tout polypeptide dans la séquence duquel une ou des liaisons peptidiques ont été modifiées, comme par exemple les liaisons carba, rétro, inverso, rétro-inverso, réduites, et méthylène-oxy,

(g) tout polypeptide dont au moins un antigène est reconnu par anticorps dirigé contre un polypeptide de référence,

25 - le pourcentage d'identité caractérisant l'homologie de deux fragments peptidiques comparés est selon la présente invention d'au moins 50% et de préférence au moins 70 %.

30 Etant donné qu'un virus possédant une activité enzymatique transcriptase inverse peut être génétiquement caractérisé aussi bien sous forme d'ARN que d'ADN, il sera fait mention aussi bien de l'ADN que de l'ARN viral pour caractériser les séquences relatives à un virus possédant une telle activité transcriptase inverse, dit MSRV-1 selon la présente description.

35 Les expressions d'ordre utilisées dans la présente description et les revendications, telles que

"première séquence nucléotidique" ne sont pas retenues pour exprimer un ordre particulier, mais pour définir plus clairement l'invention.

Par détection d'une substance ou agent, on entend 5 ci-après aussi bien une identification, qu'une quantification, ou une séparation ou isolement de ladite substance ou dudit agent.

L'invention sera mieux comprise à la lecture de la description détaillée qui va suivre faite en référence 10 aux figures annexées dans lesquelles :

- la figure 1 représente des consensus généraux en acides nucléiques des clones MSRV-1B amplifiés par la technique PCR dans la région "pol" définie par Shih (12), à partir d'ADN viral issu des lignées LM7PC et PLI-2, et 15 identifiés sous les références SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, et SEQ ID NO 6, et le consensus commun avec amorces d'amplification portant la référence SEQ ID NO 7,

- la figure 2 donne la définition d'une trame de lecture fonctionnelle pour chaque famille de type 20 MSRV-1B/"PCR pol", lesdites familles A à D étant définies respectivement par les séquences nucléotidiques SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, et SEQ ID NO 6, décrites à la figure 1,

- la figure 3 donne un exemple de consensus des 25 séquences de MSRV-2B, identifié par SEQ ID NO 11,

- la figure 4 est une représentation de l'activité transcriptase inverse (RT) en dpm (désintégration par minute), dans les fractions de saccharose prélevées sur un gradient de purification des 30 virions produits par les lymphocytes B en culture d'un patient atteint de SEP,

- la figure 5 donne, dans les mêmes conditions expérimentales qu'à la figure 4, le dosage de l'activité transcriptase inverse dans la culture d'une lignée de 35 lymphocytes B obtenue à partir d'un témoin exempt de sclérose en plaques,

- la figure 6 représente la séquence nucléotidique du clone PSJ17 (SEQ ID NO 9),

- la figure 7 représente la séquence nucléotidique SEQ ID NO 8, du clone dénommé M003-P004,

5 - la figure 8 représente la séquence nucléotidique SEQ ID NO 2 du clone F11-1 ; la partie repérée entre les deux flèches dans la région de l'amorce correspond à une variabilité imposée par le choix de l'amorce ayant servi au clonage de F11-1 ; sur cette même 10 figure, la traduction en acides aminés est représentée,

- la figure 9 représente la séquence nucléotidique SEQ ID NO 1, et une trame fonctionnelle de lecture possible en acides aminés de SEQ ID NO 1; sur cette séquence, les séquences consensus du gène pol sont 15 soulignées,

- les figures 10 et 11 donnent les résultats d'une PCR, sous forme de photographie sous lumière ultra-violette d'un gel d'agarose imprégné de bromure d'éthidium, des produits d'amplification obtenus à partir 20 des amorces identifiées par SEQ ID NO 16, SEQ ID NO 17, SEQ ID NO 18, et SEQ ID NO 19.

- la figure 12 donne une représentation matricielle de l'homologie entre SEQ ID NO 1 de MSRV-1 et celle d'un rétrovirus endogène dénommé HSERV9 ; cette 25 homologie d'au moins 65 % est mise en évidence par un trait plein, l'absence de trait signifiant une homologie inférieure à 65 % ;

- la figure 13 représente la séquence nucléotidique SEQ ID NO 46 du clone FBd3,

30 - la figure 14 représente l'homologie de séquence entre le clone FBd3 et le rétrovirus HSERV-9 ;

- la figure 15 représente la séquence nucléotidique SEQ ID NO 51 du clone t pol ;

- les figures 16 et 17 représentent 35 respectivement les séquences nucléotidiques SEQ ID NO 52

et SEQ ID NO 53, des clones JLBC1 et JLBC2 respectivement ;

- la figure 18 représente l'homologie de séquence entre le clone JLBC1 et le clone FBd3,

5 - et la figure 19 l'homologie de séquence entre le clone JLBC2 et le clone FBd3 ;

- la figure 20 représente l'homologie de séquence entre les clones JLBC1 et JLBC2 ;

10 - les figures 21 et 22 représentent l'homologie de séquence entre le rétrovirus HSERV-9, et respectivement les clones JLBC1 et JLBC2 ;

- la figure 23 représente la séquence nucléotidique SEQ ID NO 56 du clone GM3 ;

15 - la figure 24 représente l'homologie de séquence entre le rétrovirus HSERV-9 et le clone GM3 ;

- la figure 25 représente la localisation des différents clones étudiés, par rapport au génome du rétrovirus connu ERV9 ;

20 - la figure 26 représente la position des clones F11-1, M003-P004, MSRV-1B et PSJ17 dans la région dénommée ci-après MSRV-1 pol * ;

- la figure 27, éclatée en trois figures successives 27a, 27b, 27c représente un cadre de lecture possible, couvrant l'ensemble du gène pol ;

25 - la figure 28 représente selon SEQ ID NO 40, la séquence nucléotidique codant pour le fragment peptidique POL2B, ayant la séquence en acides aminés identifiée par SEQ ID NO 39 ;

- la figure 29 représente les valeur de DO 30 (tests ELISA) à 492 nm obtenues pour 29 sérums de patients SEP et 32 sérums de témoins sains testés avec un anticorps anti-IgG ;

- la figure 30 représente les valeurs de DO 35 (tests ELISA) à 492 nm obtenues pour 36 sérums de patients SEP et 42 sérums de témoins sains testés avec un anticorps anti-IgM ;

- les figures 31 à 33 représentent les résultats obtenus (intensité relative des spots) pour 43 octapeptides chevauchants couvrant la séquence en acides aminés 61-110, selon la technique Spotscan, 5 respectivement avec un pool de sérums de SEP, avec un pool de sérums témoins et avec le pool de sérums SEP après déduction d'un bruit de fond correspondant au signal maximum détecté sur au moins un octapeptide avec le sérum témoin (intensité = 1), étant entendu que ces sérums ont 10 été dilués au 1/50ème. La barre à l'extrême droite représente un standard d'échelle graphique sans rapport avec le test sérologique ;

- la figure 34 représente les SEQ ID NO 41 et SEQ ID NO 42 de deux polypeptides comprenant 15 immuno-dominantes, tandis que SEQ ID NO 43 et 44 représentent des polypeptides immuno-réactifs et spécifiques à la SEP.

20 **EXEMPLE 1 : OBTENTION DE CLONES DENOMMÉS MSRV-1B ET MSRV-2B, DEFINISSANT RESPECTIVEMENT UN RETROVIRUS MSRV-1 ET UN AGENT CO-INFECTANT MSRV2, PAR AMPLIFICATION PCR "NICHEE" DES REGIONS POL CONSERVÉES DES RETROVIRUS, SUR DES PRÉPARATIONS DE VIRIONS ISSUES DES LIGNEES LM7PC**
25 **ET PLI-2**

Une technique PCR dérivée de la technique publiée par Shih (12) a été utilisée. Cette technique permet, par traitement de tous les composants du milieu réactionnel 30 par la DNase, d'éliminer toute trace d'ADN contaminant. Elle permet parallèlement, par l'utilisation d'amorces différentes mais chevauchantes dans deux séries successives de cycles d'amplifications PCR, d'augmenter les chances d'amplifier un ADN synthétisé à partir d'une 35 quantité d'ARN faible au départ et encore réduite dans l'échantillon par l'action parasite de la DNase sur l'ARN.

En effet, la DNase est utilisée dans des conditions d'activité en excès qui permettent d'éliminer toute trace d'ADN contaminant, avant inactivation de cette enzyme restant dans l'échantillon par chauffage à 85°C pendant 10 minutes. Cette variante de la technique PCR décrite par Shih (12), a été utilisée sur un ADNC synthétisé à partir des acides nucléiques de fractions de particules infectantes purifiées sur gradient de saccharose, selon la technique décrite par H. Perron (13), à partir de l'isolat 10 "POL-2" (ECACC n°V92072202) produit par la lignée PLI-2 (ECACC n°92072201) d'une part, et à partir de l'isolat MS7PG (ECACC n°V93010816) produit par la lignée LM7PC (ECACC n°93010817) d'autre part. Ces cultures ont été obtenues selon les méthodes ayant fait l'objet des 15 demandes de brevet publiées sous les n° WO 93/20188 et WO 93/20189.

Après clonage avec le TA Cloning Kit® des produits amplifiés par cette technique et analyse de la séquence à l'aide d'un séquençeur automatique 20 "Automatic Sequencer, modèle 373A" d'Applied Biosystems, les séquences ont été analysées à l'aide du logiciel Geneworks®, sur la dernière version disponible de la banque de données Genebank®.

Les séquences clonées et séquencées à partir de 25 ces échantillons correspondent notamment à deux types de séquences: un premier type de séquence, retrouvé dans la majorité des clones (55 % des clones issus des isolats POL-2 des culture PLI-2, et, 67 % des clones issus des isolats MS7PG des cultures LM7PC), qui correspond à une 30 famille de séquences "pol" proches mais différentes du rétrovirus endogène humain dénommé ERV-9 ou HSERV-9, et un second type de séquence qui correspond à des séquences très fortement homologues à une séquence attribuée à un autre agent infectant et/ou pathogène dénommé MSRV-2.

35 Le premier type de séquences représentant la majorité des clones est constituée de séquences dont la

variabilité permet de définir quatre sous-familles de séquences. Ces sous-familles sont suffisamment proches entre elles pour qu'on puisse les considérer comme des quasi-espèces provenant d'un même rétrovirus, tel que cela est bien connu pour le rétrovirus HIV-1 (14), ou comme le résultat de l'interférence avec plusieurs provirus endogènes co-régulés dans les cellules productrices. Ces éléments endogènes plus ou moins défectifs sont sensibles aux mêmes signaux de régulation générés éventuellement par un provirus répliquatif, puisqu'ils appartiennent à la même famille de rétrovirus endogènes (15). Cette nouvelle famille de rétrovirus endogènes ou, alternativement, cette nouvelle espèce rétrovirale dont on a obtenu en culture la génération de quasi-espèces, et qui contient un consensus des séquences décrites ci-dessous est dénommée MSRV-1B.

Dans la figure 1 sont présentés les consensus généraux des séquences des différents clones MSRV-1B séquencés lors de cette expérience, ces séquences étant respectivement identifiées par SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, et SEQ ID NO 6. Ces séquences présentent une homologie en acides nucléiques allant de 70 % à 88 % avec la séquence HSERV9 référencée X57147 et M37638 dans la base de données Genebank®. Quatre séquences nucléiques "consensus" représentatives de différentes quasi-espèces d'un rétrovirus MSRV-1B éventuellement exogène, ou de différentes sous-familles d'un rétrovirus endogène MSRV-1B, ont été définies. Ces consensus représentatifs sont présentés dans la figure 2, avec la traduction en acides aminés. Une trame de lecture fonctionnelle existe pour chaque sous-famille de ces séquences MSRV-1B, et l'on peut voir que la trame de lecture ouverte fonctionnelle correspond à chaque fois à la séquence en acides aminés venant en deuxième ligne sous la séquence en acide nucléiques. Le consensus général de la séquence MSRV-1B, identifié par SEQ ID NO 7 et obtenu par cette technique PCR dans la région "pol" est présenté dans la figure 1.

Le deuxième type de séquence représentant la majorité des clones séquencés est représenté par la séquence MSRV-2B présentée dans la figure 3 et identifiée par SEQ ID NO 11. Les différences observées dans les 5 séquences correspondant aux amorces PCR s'expliquent par l'utilisation d'amorces dégénérées en mélange utilisées dans des conditions techniques différentes.

La séquence MSRV-2B (SEQ ID NO 11) est suffisamment divergente des séquences rétrovirales déjà 10 décrites dans les banques de données pour qu'on puisse avancer qu'il s'agit d'une région de séquence appartenant à un nouvel agent infectant, dénommé MSRV-2. Cet agent infectant s'apparenterait à priori, d'après l'analyse des premières séquences obtenues, à un rétrovirus, mais, étant 15 donnée la technique utilisée pour obtenir cette séquence, il pourrait aussi s'agir d'un virus à ADN dont le génome code pour une enzyme qui possède accessoirement une activité transcriptase inverse comme c'est le cas, par exemple, pour le virus de l'hépatite B, HBV (12). De plus, 20 le caractère aléatoire des amorces dégénérées utilisées pour cette technique d'amplification PCR peut très bien avoir permis, du fait d'homologies de séquences imprévues ou de sites conservés dans le gène d'une enzyme apparentée, l'amplification d'un acide nucléique provenant 25 d'un agent pathogène et/ou co-infectant prokaryote ou eukaryote (protiste).

EXEMPLE 2 : OBTENTION DE CLONES DENOMMÉS MSRV-1B
30 ET MSRV-2B, DEFINISSANT UNE FAMILLE MSRV-1 ET MSRV2, PAR
AMPLIFICATION PCR "NICHEE" DES REGIONS POL CONSERVÉES DES
RETROVIRUS, SUR DES PRÉPARATIONS DE LYMPHOCYTES B D'UN
NOUVEAU CAS DE SEP

35 La même technique PCR modifiée d'après la technique de Shih (12) a été utilisée pour amplifier et

séquencer le matériel nucléique ARN présent dans une fraction de virions purifiée au pic d'activité transcriptase inverse "de type LM7", sur gradient de saccharose selon la technique décrite par H. Perron (13), 5 et selon les protocoles mentionnés dans l'exemple 1, à partir d'une lignée lymphoblastoïde spontanée, obtenue par auto-immortalisation en culture de lymphocytes B d'un patient SEP séropositif pour le virus d'Epstein-Barr (EBV), après mise en culture des cellules 10 lymphoïdes sanguines dans un milieu de culture approprié contenant une concentration appropriée de cyclosporine A. Une représentation de l'activité transcriptase inverse dans les fractions de saccharose prélevées sur un gradient de purification des virions produits par cette lignée est 15 présentée dans la figure 4. De même, les surnageants de culture d'une lignée B obtenue dans les mêmes conditions à partir d'un témoin exempt de sclérose en plaques ont été traités dans les mêmes conditions, et le dosage de l'activité transcriptase inverse dans les fractions du 20 gradient de saccharose s'est avéré négatif partout (bruit de fond) et est présenté dans la figure 5. La fraction 3 du gradient correspondant à la lignée B de SEP et la même fraction sans activité transcriptase inverse du gradient témoin non-SEP, ont été analysées par la même 25 technique RT-PCR que précédemment, dérivée de Shih (12), suivie des mêmes étapes de clonage et de séquençage tels que décrites dans l'exemple 1.

Il est tout à fait notable que les séquences de type MSRV-1 et MSRV-2 soient retrouvées dans le seul 30 matériel associé à un pic d'activité transcriptase inverse "de type LM7" provenant de la lignée lymphoblastoïde B de SEP. Ces séquences n'ont pas été retrouvées avec le matériel de la lignée lymphoblastoïde B témoin (non-SEP) dans 35 26 clones recombinants pris au hasard. Seules les séquences contaminantes de type Mo-MuLV provenant de la transcriptase inverse commerciale utilisée pour l'étape de

synthèse de l'ADNc et des séquences sans analogie rétrovirale particulière ont été retrouvées chez ce témoin, du fait de l'amplification "consensus" des séquences de polymérases homologues que réalise cette 5 technique PCR. De plus, l'absence de cible concentrée qui fait compétition pour la réaction d'amplification dans l'échantillon témoin permet l'amplification de contaminants dilués. La différence de résultats est à l'évidence hautement significative (chi-2, p<0,001).

10

EXEMPLE 3 : OBTENTION D'UN CLONE PSJ17,
DEFINISSANT UN RETROVIRUS MSRV-1, PAR REACTION DE
TRANSCRIPTASE INVERSE ENDOGENE SUR UNE PREPARATION DE
15 **VIRION ISSUE DE LA LIGNEE PLI-2.**

Cette approche vise à obtenir des séquences d'ADN rétrotranscrites à partir de l'ARN supposé rétroviral dans l'isolat, en utilisant l'activité transcriptase inverse 20 présente dans ce même isolat. Cette activité transcriptase inverse ne peut théoriquement fonctionner qu'en présence d'un ARN rétroviral, lié à un ARNt amorce ou hybridé à des brins courts d'ADN déjà rétro-transcrits dans les particules rétrovirales (16). Ainsi l'obtention de 25 séquences rétrovirales spécifiques dans un matériel contaminé par des acides nucléiques cellulaires, a été optimisée selon ces auteurs grâce à l'amplification enzymatique spécifique des portions d'ARN viraux par une activité transcriptase inverse virale. Les auteurs ont 30 pour cela, déterminé les conditions physico-chimiques particulières dans lesquelles cette activité enzymatique de transcription inverse sur des ARN contenus dans des virions pouvait être effective *in vitro*. Ces conditions correspondent à la description technique des protocoles 35 présentés ci-dessous (réaction de RT endogène, purification, clonage et séquençage).

L'approche moléculaire a consisté à utiliser une préparation de virion concentré, mais non purifié, obtenu à partir des surnageants de culture de la lignée PLI-2 préparés selon la méthode suivante : les surnageants de culture sont collectés deux fois par semaine, pré-centrifugés à 10 000 trs/min pendant 30 minutes pour éliminer les débris cellulaires, et ensuite, congelés à -80°C ou utilisés tels quels pour les étapes suivantes. Les surnageants frais ou décongelés sont centrifugés sur un coussin de PBS-glycérol 30% à 100 000g (ou 30 000 trs/min dans un rotor LKB-HITACHI de type 45 T) pendant 2h à 4°C. Après élimination du surnageant, le culot sédimen^{té} est repris dans un petit volume de PBS et constitue la fraction de virion concentré, mais non purifié. Cet échantillon viral concentré mais non purifié a été utilisé pour effectuer une réaction dite de transcription inverse endogène, telle que décrite ci-après.

Un volume de 200 µl de virion purifié selon le protocole décrit ci-dessus et contenant une activité transcriptase inverse d'environ 1-5 millions de dpm est décongelé à 37°C jusqu'à apparition d'une phase liquide, puis placé sur de la glace. Un tampon 5 fois concentré a été préparé avec les composants suivants: Tris-HCl pH 8,2, 500 mM; NaCl 75 mM; MgCl₂ 25 mM; DTT 75 mM et NP 40 0,10 % ; 100 µl de tampon 5X + 25 µl d'une solution de dATP 100mM + 25 µl d'une solution de dTTP 100 mM + 25 µl d'une solution de dGTP 100 mM + 25 µl d'une solution de dCTP 100 mM + 100 µl d'eau distillée stérile + 200 µl de la suspension de virions (activité T.I. de 5 millions de DPM) dans le PBS ont été mélangés et incubés à 42°C pendant 3 heures. Après cette incubation le mélange réactionnel est directement ajouté à un mélange tamponné phénol/chloroforme/alcool isoamylique (Sigma ref. P 3803); la phase aqueuse est collectée et un volume d'eau distillée stérile est ajouté à la phase organique pour

ré-extraire le matériel nucléique résiduel. Les phases aqueuses collectées sont regroupées et les acides nucléiques contenus sont précipités par addition d'acétate de sodium 3M, pH 5,2 au 1/10 de volume + 2 volumes 5 d'éthanol + 1 µl de glycogène (Boehringer-Mannheim ref. 901 393) et mise à -20°C de l'échantillon pendant 4h ou la nuit à +4°C. Le précipité obtenu après centrifugation est ensuite lavé avec de l'éthanol à 70% et resuspendu dans 60 ml d'eau distillée. Les produits de 10 cette réaction ont ensuite été purifiés, clonés et séquencés selon le protocole décrit ci-après: des ADN bouts francs avec des adénines non-appariées aux extrémités ont été générés: une réaction de "remplissage" a d'abord été effectuée: 25 µl de la solution d'ADN 15 précédemment purifiée ont été mélangés avec 2 µl d'une solution 2,5 mM contenant, en quantité équimolaire, dATP + dGTP + dTTP + dCTP / 1 µl d'ADN polymérase T4 (Boehringer-Mannheim ref. 1004 786) / 5 µl de 10X "incubation buffer for restriction enzyme" (Boehringer- 20 Mannheim ref. 1417 975) / 1 µl d'une solution à 1 % de sérum-albumine bovine / 16 µl d'eau distillée stérile. Ce mélange a été incubé 20 minutes à 11°C. 50 µl de tampon TE et 1 µl de glycogène (Boehringer-Mannheim ref. 901 393) y ont été ajoutés avant extraction des acides nucléiques 25 avec du phénol/chloroforme/alcool isoamylrique (Sigma ref. P 3803), et précipitation à l'acétate de sodium comme décrit précédemment. L'ADN précipité après centrifugation est resuspendu dans 10 µl de tampon 10 mM Tris pH 7,5. Puis, 5 µl de cette suspension ont été 30 mélangés avec 20µl de tampon Taq 5X, 20 µl de 5mM dATP, 1 µl (5U) de Taq ADN polymérase (AmpliTaqTM) et 54 µl d'eau distillée stérile. Ce mélange est incubé 2 h à 75°C avec un film d'huile à la surface de la solution. L'ADN en suspension dans la solution aqueuse prélevée en dessous du 35 film d'huile après incubation est précipité comme décrit précédemment et resuspendu dans 2 µl d'eau distillée

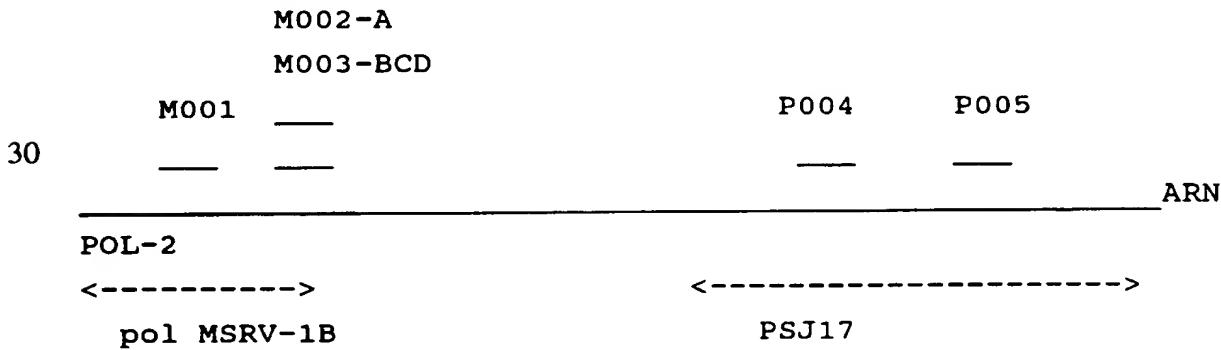
stérile. L'ADN obtenu a été inséré dans un plamide à l'aide du kit TA Cloning™. Les 2 µl de solution d'ADN ont été mélangés avec 5 µl d'eau distillée stérile, 1µl d'un tampon de ligation 10 fois concentré "10X LIGATION BUFFER", 2 µl de "pCRTM VECTOR" (25 ng/ml) et 1 µl de "TA DNA LIGASE". Ce mélange a été incubé une nuit à 12°C. Les étapes suivantes ont été réalisées conformément au instructions du kit TA Cloning® (British Biotechnology). A la fin de la procédure, les colonies blanches de bactéries recombinantes (white) ont été repiquées pour être cultivées et permettre l'extraction des plasmides incorporés selon la procédure dite de "miniprep" (17). La préparation de plasmide de chaque colonie recombinante a été coupée par une enzyme de restriction appropriée et analysée sur gel d'agarose. Les plasmides possédant un insert détecté sous lumière UV après marquage du gel au bromure d'éthidium, ont été sélectionnés pour le séquençage de l'insert, après hybridation avec une amorce complémentaire du promoteur Sp6 présent sur le plasmide de clonage du TA cloning kit®. La réaction préalable au séquençage a ensuite été effectuée selon la méthode préconisée pour l'utilisation du kit de séquençage "Prism ready reaction kit dye deoxyterminator cycle sequencing kit" (Applied Biosystems, ref. 401384) et le séquençage automatique a été réalisé avec l'appareil "Automatic Sequencer, modèle 373 A" Applied Biosystems, selon les instructions du fabricant.

L'analyse discriminante sur les banques de données informatiques des séquences clonées à partir des fragments d'ADN présents dans le mélange réactionnel a permis de mettre en évidence une séquence de type rétroviral. Le clone correspondant PSJ17 a été entièrement séquencé et la séquence obtenue, présentée dans la figure 6 et identifiée apr SEQ ID N°9, a été analysée à l'aide du logiciel "Geneworks®" sur les banques de données actualisées "Genebank®". L'analyse des banques de données

n'a pas permis de trouver de séquence identique déjà décrite. Seule une homologie partielle a pu être retrouvée avec certains éléments rétroviraux connus. L'homologie relative la plus intéressante concerne un rétrovirus 5 endogène dénommé ERV-9, ou HSERV-9, selon les références (18).

**EXEMPLE 4 : AMPLIFICATION PCR DE LA SEQUENCE
10 NUCLEIQUE CONTENUE ENTRE LA REGION 5' DEFINIE PAR LE CLONE
"POL MSRV-1B" ET LA REGION 3' DEFINIE PAR LE CLONE PSJ17.**

Cinq oligonucléotides, M001, M002-A, M003-BCD, P004 et P005, ont été définis pour amplifier de l'ARN 15 provenant de virions purifiés POL-2. Des réactions de contrôle ont été effectuées de manière à contrôler la présence de contaminants (réaction sur de l'eau). L'amplification consiste en une étape de RT-PCR selon le protocole décrit dans l'Exemple 2, suivie d'une PCR 20 "nichée" selon le protocole PCR décrit dans le document EP-A-0 569 272. Dans le premier cycle RT-PCR, les amorces M001 et P004 ou P005 sont utilisées. Dans le deuxième cycle PCR, les amorces M002-A ou M003-BCD, et l'amorce P004 sont utilisées. Les amorces sont positionnées 25 comme suit :



Leur composition est :

amorce M001: GGTCITICCICAIGG (SEQ ID NO 20)
 amorce M002-A: TTAGGGATAGCCCTCATCTCT (SEQ ID NO 21)
 amorce M003-BCD: TCAGGGATAGCCCCATCTAT (SEQ ID NO 22)
 5 amorce P004: AACCCTTGCCACTACATCAATT (SEQ ID NO 23)
 amorce P005: GCGTAAGGACTCCTAGAGCTATT (SEQ ID NO 24)

Le produit d'amplification "nichée" obtenu et dénommé M003-P004 est présenté dans la figure 7, et correspond à la séquence SEQ ID NO 8.

10

EXEMPLE 5 : AMPLIFICATION ET CLONAGE D'UNE PORTION DU GENOME RETROVIRAL MSRV-1 A L'AIDE D'UNE SEQUENCE DEJA IDENTIFIEE, DANS UN ECHANTILLON DE VIRUS
 15 PURIFIE AU PIC D'ACTIVITE TRANSCRIPTASE INVERSE

Une technique PCR dérivée de la technique publiée par Frohman (19) a été utilisée. La technique dérivée permet, à l'aide d'une amorce spécifique en 3' du génome à 20 amplifier, d'élonguer la séquence vers la région 5' du génome à analyser. Cette variante technique est décrite dans la documentation de la firme "Clontech Laboratories Inc., (Palo-Alto California, USA) fournie avec son produit "5'-AmpliFINDER™ RACE Kit", qui a été utilisé sur une 25 fraction de virion purifié comme décrit précédemment.

Les amorces 3' spécifiques utilisées dans le protocole du kit pour la synthèse du cDNA et l'amplification PCR sont respectivement complémentaires aux séquences MSRV-1 suivantes :

30

CDNA :	TCATCCATGTACCGAAGG	(SEQ ID N°25)
amplification :	ATGGGGTTCCCAAGTTCCCT	(SEQ ID N°26)

Les produits issus de la PCR ont été purifiés 35 après purification sur gel d'agarose selon les méthodes conventionnelles (17), puis resuspendus dans 10 ml d'eau

distillée. Une des propriétés de la polymérase Taq consistant à ajouter une adénine à l'extémité 3' de chacun des deux brins d'ADN, l'ADN obtenu a été directement inséré dans un plamide à l'aide du kit TA Cloning™ (British Biotechnology). Les 2 µl de solution d'ADN ont été mélangés avec 5 µl d'eau distillée stérile, 1 µl d'un tampon de ligation 10 fois concentré "10X LIGATION BUFFER", 2 µl de "pCRTM VECTOR" (25 ng/ml) et 1 µl de "TA DNA LIGASE". Ce mélange a été incubé une nuit à 12°C.

Les étapes suivantes ont été réalisées conformément au instructions du kit TA Cloning® (British Biotechnology). A la fin de la procédure, les colonies blanches de bactéries recombinantes (white) ont été repiquées pour être cultivées et permettre l'extraction des plasmides incorporés selon la procédure dite de "miniprep" (17). La préparation de plasmide de chaque colonie recombinante a été coupée par une enzyme de restriction appropriée et analysée sur gel d'agarose. Les plasmides possédant un insert détecté sous lumière UV après marquage du gel au bromure d'éthidium, ont été sélectionnés pour le séquençage de l'insert, après hybridation avec une amorce complémentaire du promoteur Sp6 présent sur le plasmide de clonage du TA Cloning Kit®. La réaction préalable au séquençage a ensuite été effectuée selon la méthode préconisée pour l'utilisation du kit de séquençage "Prism ready reaction kit dye deoxyterminator cycle sequencing kit" (Applied Biosystems, ref. 401384) et le séquençage automatique a été réalisé avec l'appareil "Automatic Sequencer, modèle 373 A" Applied Biosystems selon les instructions du fabricant.

Cette technique a d'abord été appliquée à deux fractions de virion purifié comme décrit ci-après, sur saccharose à partir de l'isolat "POL-2" produit par la lignée PLI-2 d'une part, et à partir de l'isolat MS7PG 35 produit par la lignée LM7PC d'autre part. Les surnageants de cultures sont collectés deux fois par semaine,

pré-centrifugés à 10 000 trs/min pendant 30 minutes pour éliminer les débris cellulaires, et ensuite, congelés à -80°C ou utilisés tels quels pour les étapes suivantes. Les surnageants frais ou décongelés sont centrifugés sur 5 un coussin de PBS-glycérol 30% à 100 000g (ou 30 000 trs/min dans un rotor LKB-HITACHI de type 45 T) pendant 2 h à 4°C. Après élimination du surnageant, le culot sédimené est repris dans un petit volume de PBS et constitue la fraction de virions concentrés, mais non 10 purifiés. Le virus concentré est ensuite déposé sur un gradient de sucrose dans un tampon PBS stérile (15 à 50 % poids/poids) et ultracentrifugé à 35 000 trs/min (100 000g) pendant 12 h à +4°C dans un rotor à godets. 10 fractions sont recueillies et 20 µl sont prélevés dans 15 chaque fraction après homogénéisation pour y doser l'activité transcriptase inverse selon la technique décrite par H. Perron (3). Les fractions contenant le pic d'activité RT "de type LM7" sont ensuite diluées dans du tampon PBS stérile et ultracentrifugées une heure à 20 35 000 trs/min (100 000g) pour sédimenter les particules virales. Le culot de virion purifié ainsi obtenu est alors repris dans un petit volume d'un tampon adéquat pour l'extraction d'ARN. La réaction de synthèse de cDNA mentionnée plus haut est réalisée sur cet ARN extrait de 25 virion extracellulaire purifié. L'amplification PCR selon la technique citée plus-haut a permis d'obtenir le clone F1-11 dont la séquence identifiée par SEQ ID NO 2, est présentée dans la figure 8.

Ce clone permet de définir, avec les différents 30 clones préalablement séquencés, une région de longueur importante (1,2 kb) représentative du gène "pol" du rétrovirus MSRV-1, telle que présentée dans la figure 9. Cette séquence dénommée SEQ ID NO 1 est reconstituée à partir de différents clones se recouvrant à leurs 35 extrémités, en corrigeant les artefacts liés aux amorces et aux techniques d'amplification ou de clonage, qui

interromperaient artificiellement la trame de lecture de l'ensemble. Cette séquence sera identifiée ci-après sous la dénomination "région MSRV-1 pol *". Son degré d'homologie avec la séquence HSERV-9 est représenté à la 5 figure 12.

Dans la figure 9, la trame de lecture potentielle avec sa traduction en acides aminés est présentée en-dessous de la séquence en acides nucléiques.

10

EXEMPLE 6 : DETECTION DE SEQUENCES SPECIFIQUES MSRV-1 ET MSRV-2 DANS DIFFERENTS ECHANTILLONS DE PLASMA PROVENANT DE PATIENTS ATTEINTS DE SEP OU DE TEMOINS.

15

Une technique PCR a été utilisée pour détecter les génomes MSRV-1 et MSRV-2 dans des plasmas obtenus après prélèvement de sang sur EDTA de patients atteints de SEP et de témoins non-SEP.

20

L'extraction des ARN de plasma a été effectuée selon la technique décrite par P. Chomzynski (20), après addition d'un volume du tampon contenant du guanidinium thiocyanate à 1 ml de plasma gardé congelé à -80°C après recueil.

25

Pour MSRV-2, la PCR a été effectuée dans les mêmes conditions et avec les amorces suivantes :

- amorce 5', identifiée par SEQ ID NO 14
5' GTAGTTCGATGTAGAAAGCC 3' ;
- amorce 3', identifiée par SEQ ID NO 15
5' GCATCCGGCAACTGCACG 3'.

30

Cependant des résultats similaires ont aussi été obtenus avec les amorces PCR suivantes dans deux amplifications successives par PCR "nichée" sur échantillons d'acides nucléiques non-traités par la DNase.

Les amorces utilisées pour cette première étape de 40 cycles avec une température d'hybridation de 48°C sont les suivantes :

- amorce 5', identifiée par SEQ ID NO 27

5 5' GCCGATATCACCCGCCATGG 3', correspondant à une amorce PCR MSRV-2 5', pour une première PCR sur prélèvement de patients,

-amorce 3', identifiée par SEQ ID NO 28

10 5' GCATCCGGCAACTGCACG 3', correspondant à une amorce PCR MSRV-2 3', pour une première PCR sur prélèvement de patients.

Après cette étape, 10 μ l du produit d'amplification sont prélevés et utilisés pour réaliser une deuxième amplification PCR dite "nichée" avec des 15 amorces situées à l'intérieur de la région déjà amplifiée. Cette deuxième étape se déroule sur 35 cycles, avec une température d'hybridation des amorces ("annealing") de 50°C. Le volume réactionnel est de 100 μ l.

Les amorces utilisées pour cette deuxième étape 20 sont les suivantes :

- amorce 5', identifiée par SEQ ID NO 29

5' CGCGATGCTGGTTGGAGAGC 3', correspondant à une amorce PCR MSRV-2 5', pour une PCR-nichée sur prélèvement de patients,

25 - amorce 3', identifiée par SEQ ID NO 30

5' TCTCCACTCCGAATTCCG 3', correspondant à une amorce PCR MSRV-2 3', pour une PCR-nichée sur prélèvement de patients.

Pour MSRV-1, l'amplification a été effectuée en 30 deux étapes. De plus, l'échantillon d'acides nucléiques est préalablement traité par la DNase et un contrôle PCR sans RT (transcriptase inverse AMV) est effectué sur les deux étapes d'amplification, de manière à vérifier que l'amplification RT-PCR provient exclusivement de l'ARN 35 MSRV-1. En cas de contrôle sans RT positif, l'échantillon

aliquoté d'ARN de départ est à nouveau traité par la DNase et amplifié à nouveau.

Le protocole de traitement par la DNase dépourvue d'activité RNase est le suivant: l'ARN extrait est 5 aliquoté en présence de "RNase inhibitor" (Boehringer-Mannheim) dans de l'eau traitée au DEPC à une concentration finale de 1 µg dans 10 µl; à ces 10 µl, est ajouté 1µl de "RNase-free DNase" (Boehringer-Mannheim) et 1,2 µl de tampon à pH 5 contenant 0,1 M/l d'acétate de 10 sodium et 5 mM/l de MgSO₄; le mélange est incubé 15 min. à 20°C et porté à 95°C pendant 1,5 min. dans un "thermocycler".

La première étape de RT-PCR MSRV-1 est effectuée selon une variante du procédé d'amplification d'ARN tel 15 que décrit dans la demande de brevet n° EP-A-0 569 272. Notamment, l'étape de synthèse d'ADNc est effectuée à 42°C pendant une heure; l'amplification PCR se déroule sur 40 cycles, avec une température d'hybridation des amorces ("annealing") de 53°C. Le volume réactionnel est de 100µl.

20 Les amorces utilisées pour cette première étape sont les suivantes :

- amorce 5', identifiée par SEQ ID NO 16
- 5' AGGAGTAAGGAAACCCAACGGAC 3' ;
- amorce 3', identifiée par SEQ ID NO 17
- 5' TAAGAGTTGCACAAGTGC 3'.

Après cette étape, 10µl du produit 25 d'amplification sont prélevés et utilisés pour réaliser une deuxième amplification PCR dite "nichée" avec des amorces situées à l'intérieur de la région déjà amplifiée. Cette deuxième étape se déroule sur 35 cycles, avec une température d'hybridation des amorces ("annealing") de 53°C. Le volume réactionnel est de 100µl.

Les amorces utilisées pour cette deuxième étape sont les suivantes :

35

- amorce 5', identifiée par SEQ ID NO 18
- 5' TCAGGGATAGCCCCCATCTAT 3' ;

- amorce 3', identifiée par SEQ ID NO 19
5' AACCCCTTGCCACTACATCAATT 3'.

Dans les figures 10 et 11, sont présentés les résultats de PCR sous forme de photographies sous lumière ultra-violette de gels d'agarose imprégnés de bromure d'éthidium, dans lesquels on a effectué une électrophorèse des produits d'amplification PCR déposés séparément dans les différents puits.

La photographie du haut (figure 10) représente le 10 résultat de l'amplification spécifique MSRV-2.

Le puits numéro 8 contient un mélange de marqueurs de poids moléculaire ADN et les puits 1 à 7 représentent, dans l'ordre, les produits amplifiés à partir des ARN totaux de plasmas provenant de 4 témoins 15 sains exempts de SEP (puits 1 à 4) et de 3 patients atteints de SEP, à différents stades de la maladie (puits 5 à 7).

Dans cette série, du matériel nucléique MSRV-2 est détecté dans le plasma d'un cas de SEP sur les 3 20 testés et dans aucun des 4 plasmas témoins. D'autres résultats obtenus sur des séries plus étendues confirment ces résultats.

La photographie du bas (figure 11) représente le 25 résultat de l'amplification spécifique par RT-PCR "nichée" MSRV-1:

le puits n°1 contient le produit PCR effectué avec de l'eau seule, sans addition de transcriptase inverse AMV; le puits n°2 contient le produit PCR effectué avec de l'eau seule, avec addition de transcriptase 30 inverse AMV; le puits numéro 3 contient un mélange de marqueurs de poids moléculaire ADN; les puits 4 à 13 contiennent, dans l'ordre, les produits amplifiés à partir des ARN totaux extraits de fractions de gradient de saccharose (collectées du haut vers le bas) sur lequel un 35 culot de virion provenant d'un surnageant de culture infectée par MSRV-1 et MSRV-2 a été centrifugé à

l'équilibre selon le protocole décrit par H. Perron (13); dans le puits 14 rien n'a été déposé; dans les puits 15 à 17, on a déposé les produits amplifiés d'ARN extrait de plasmas provenant de 3 patients différents atteints de 5 SEP, à différents stades de la maladie.

Le génome rétroviral MSRV-1 est bien retrouvé dans la fraction du gradient de saccharose contenant le pic d'activité transcriptase inverse mesurée selon la technique décrite par H. Perron (3), avec une très forte 10 intensité (fraction 5 du gradient, déposée dans le puits n°8). Une légère amplification a eu lieu dans la première fraction (puits n°4) correspondant vraisemblablement à de l'ARN libéré par des particules lysées qui flottaient à la surface du gradient; de même, 15 des débris aggrégés ont sédimené dans la dernière fraction (fond de tube) entraînant quelques copies de génome MSRV-1 qui ont donné lieu à une amplification de faible intensité.

Sur les 3 plasmas de SEP testés dans cette série, 20 l'ARN MSRV-1 a été retrouvé dans un cas, produisant une amplification très intense (puits n°17).

Dans cette série, le génome ARN rétroviral MSRV-1 correspondant vraisemblablement à des particules de virus extracellulaire présentes dans le plasma en nombre 25 extrêmement faible, a été détecté par RT-PCR "nichée" dans un cas de SEP sur les 3 testés. D'autres résultats obtenus sur des séries plus étendues confirment ces résultats.

De plus, la spécificité des séquences amplifiées par ces techniques PCR peut être vérifiée et évaluée par 30 la technique "ELOSA" telle que décrite par F. Mallet (21) et dans le document FR-A-2 663 040.

Pour MSRV-1 les produits de la PCR nichée sus-décrise peuvent être testés dans deux systèmes ELOSA permettant de détecter séparément un consensus A et un 35 consensus B+C+D de MSRV-1, correspondant aux sous-familles décrites dans l'exemple 1 et les figures 1 et 2. En effet,

les séquences proches du consensus B+C+D sont retrouvées essentiellement dans les échantillons d'ARN provenant de virions MSRV-1 purifiés à partir de cultures ou amplifiés dans des liquides biologiques extra-cellulaires de patients 5 SEP, alors que les séquences proches du consensus A sont essentiellement retrouvées dans l'ADN cellulaire humain normal.

Le système ELOSA/MSRV-1 pour la capture et l'hybridation spécifique des produits PCR de la sous-famille A utilise un oligonucléotide de capture cpV1A avec une liaison amine en 5' et un oligonucléotide de détection biotinylé dpV1A ayant respectivement pour séquence:

- cpV1A identifié par SEQ ID NO 31
5' GATCTAGGCCACTTCTCAGGTCCAGS 3', correspondant à 15 l'oligonucléotide de capture ELOSA des produits PCR-nichée MSRV-1 effectuée avec les amorces identifiées par SEQ ID NO 16 et SEQ ID NO 17, suivie éventuellement de l'amplification avec les amorces identifiées par SEQ ID NO 18 et SEQ ID NO 19 sur prélèvement de patients ;
20 - dpV1A identifié par SEQ ID NO 32
5' CATCTTTGGICAGGCAITAGC 3' correspondant à 25 l'oligonucléotide de capture ELOSA de la sous-famille A des produits PCR-"nichée" MSRV-1 effectuée avec les amorces identifiées par SEQ ID NO 16 et SEQ ID NO 17, suivie éventuellement de l'amplification avec les amorces identifiées par SEQ ID NO 18 et SEQ ID NO 19 sur prélèvement de patients.

Le système ELOSA/MSRV-1 pour la capture et l'hybridation spécifique des produits PCR de la sous-famille B+C+D utilise le même oligonucléotide de détection biotinylé dpV1A et un oligonucléotide de capture cpV1B avec une liaison amine en 5' ayant pour séquence :

- dpV1B identifié par SEQ ID N°33
5' CTTGAGCCAGTTCTACCTGG 3', correspondant à 35 l'oligonucléotide de capture ELOSA de la sous-famille B + C + D des produits PCR-"nichée" MSRV-1 effectuée avec

les amorces identifiées par SEQ ID NO 16 et SEQ ID NO 17, suivie éventuellement de l'amplification avec les amorces identifiées par SEQ ID NO 18 et SEQ ID NO 19 sur prélèvement de patients.

5 Ce système de détection ELOSA a permis de vérifier qu'aucun des produits PCR ainsi amplifiés à partir de plasmas de patients SEP traités par la DNase ne contenait de séquence de la sous-famille A et que tous étaient positifs avec le consensus des sous-familles B, 10 C et D.

Pour MSRV-2, une technique ELOSA similaire a été évaluée sur des isolats provenant de cultures cellulaires infectées en utilisant les amorces d'amplification PCR suivantes :

15 - amorce 5', identifiée par SEQ ID NO 34
5' AGTGYTRCCMCARGGCGCTGAA 3', correspondant à une amorce PCR MSRV-2 5', pour PCR sur prélèvement de cultures,

- amorce 3', identifiée par SEQ ID NO 35
20 5' GMGGCCAGCAGSAKGTCATCCA 3', correspondant à une amorce PCR MSRV-2 3', pour PCR sur prélèvement de cultures,

et les oligonucléotides de capture avec une liaison amine en 5' cpV2, et de détection biotinylé dpV2, 25 ayant pour séquences respectives :

-cpV2 identifiée par SEQ ID NO 36
5' GGATGCCGCCTATAGCCTCTAC 3', correspondant à un oligonucléotide de capture ELOSA des produits de la PCR MSRV-2 effectuée avec les amorces SEQ ID NO 34 et 30 SEQ ID NO 35, ou éventuellement avec les amorces dégénérées définies par Shih (12),

-dpV2 identifié par SEQ ID NO 37
5' AAGCCTATCGCGTGCAGTTGCC 3', correspondant à un oligonucléotide de détection ELOSA des produits de la PCR 35 MSRV-2 effectuée avec les amorces SEQ ID NO 34 et

SEQ ID NO 35, ou éventuellement avec les amorces dégénérées définies par Shih (12).

Ce système d'amplification PCR avec un couple d'amorces différent de ceux qui ont été précédemment 5 décrits pour l'amplification sur les échantillons de patients, a permis de confirmer l'infection par MSRV-2 de cultures *in vitro* et d'échantillons d'acides nucléiques utilisés pour les travaux de biologie moléculaire.

En fin de compte, les premiers résultats de 10 détection PCR du génome d'agents pathogènes et/ou infectants, montrent qu'il est vraisemblable que du "virus" libre peut circuler dans le flux sanguin de patients en phase de poussée aigüe, en dehors du système nerveux. Ceci est compatible avec l'existence 15 quasi-systématique de "brèches" dans la barrière hémato-encéphalique des patients en phase active de SEP.

EXEMPLE 7 : OBTENTION DE SEQUENCES DU GENE "env"

20 DU GENOME RETROVIRAL MSRV-1.

Ainsi que cela a déjà été décrit dans l'exemple 5, une technique PCR dérivée de la technique publiée par Frohman (19) a été utilisée. La technique 25 dérivée permet, à l'aide d'une amorce spécifique en 3' du génome à amplifier, d'élonguer la séquence vers la région 5' du génome à analyser. Cette variante technique est décrite dans la documentation de la firme "Clontech Laboratories Inc., (Palo-Alto California, USA) fournie 30 avec son produit "5'-AmpliFINDER™ RACE Kit", qui a été utilisé sur une fraction de virion purifié comme décrit précédemment.

Afin de réaliser une amplification de la région 3' du génome rétroviral MSRV-1 en englobant la 35 région du gène "env", une étude a été réalisée pour déterminer une séquence consensus dans les régions LTR de

même type que celles du rétrovirus endogène défectif HSERV-9 (18,24), avec lequel le rétrovirus MSRV-1 présente des homologies partielles.

La même amorce 3' spécifique a été utilisée dans 5 le protocole du kit pour la synthèse du ADNc et l'amplification PCR ; sa séquence est la suivante :

GTGCTGATTGGTGTATTTACAATCC (SEQ ID NO 45)

10 La synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc) et l'amplification PCR monodirectionnelle avec l'amorce ci-dessus, ont été réalisées en une étape, selon le procédé décrit dans le brevet EP-A-0 569 272.

15 Les produits issus de la PCR ont été extraits après purification sur gel d'agarose selon les méthodes conventionnelles (17), puis resuspendus dans 10 ml d'eau distillée. Une des propriétés de la polymérase Taq consistant à ajouter une adénine à l'extémité 3' de chacun des deux brins d'ADN, l'ADN obtenu a été directement 20 inséré dans un plamide à l'aide du kit TA CloningTM (British Biotechnology). Les 2 µl de solution d'ADN ont été mélangés avec 5 µl d'eau distillée stérile, 1 µl d'un tampon de ligation 10 fois concentré "10X LIGATION BUFFER", 2 µl de "pCRTTM VECTOR" (25 ng/ml) 25 et 1 µl de "TA DNA LIGASE". Ce mélange a été incubé une nuit à 12°C. Les étapes suivantes ont été réalisées conformément au instructions du kit TA Cloning[®] (British Biotechnology). A la fin de la procédure, les colonies blanches de bactéries recombinantes (white) ont 30 été repiquées pour être cultivées et permettre l'extraction des plasmides incorporés selon la procédure dite de "miniprep" (17). La préparation de plasmide de chaque colonie recombinante a été coupée par une enzyme de restriction appropriée et analysée sur gel d'agarose. Les 35 plasmides possédant un insert détecté sous lumière UV après marquage du gel au bromure d'éthidium, ont été

sélectionnés pour le séquençage de l'insert, après hybridation avec une amorce complémentaire du promoteur Sp6 présent sur le plasmide de clonage du TA Cloning Kit®. La réaction préalable au séquençage a ensuite été 5 effectuée selon la méthode préconisée pour l'utilisation du kit de séquençage "Prism ready reaction kit dye deoxyterminator cycle sequencing kit" (Applied Biosystems, ref. 401384) et le séquençage automatique a été réalisé avec l'appareil "automatic sequencer, modèle 373 A Applied 10 Biosystems selon les instructions du fabricant.

Cette approche technique a été appliquée à un échantillon de virion concentré comme décrit ci-après, à partir d'un mélange de surnageants de culture produits par des lignées lymphoblastoïdes B telles que décrites dans 15 l'exemple 2, établies à partir des lymphocytes de patients atteints de SEP et présentant une activité transcriptase inverse détectable selon la technique décrite par Perron et coll. (3): les surnageants de cultures sont collectés deux fois par semaine, pré-centrifugés à 10 000 trs/min 20 pendant 30 minutes pour éliminer les débris cellulaires, et ensuite, congelés à -80°C ou utilisés tels quels pour les étapes suivantes. Les surnageants frais ou décongelés sont centrifugés sur un coussin de PBS-glycérol 30% à 100 000g pendant 2 h à 4°C. Après élimination du 25 surnageant, le culot sédimenté constitue l'échantillon de virions concentrés, mais non purifiés. Le culot ainsi obtenu est alors repris dans un petit volume d'un tampon adéquat pour l'extraction d'ARN. La réaction de synthèse de ADNc mentionnée plus haut est réalisée sur cet ARN 30 extrait de virion extracellulaire concentré.

L'amplification RT-PCR selon la technique citée plus-haut a permis d'obtenir le clone FBd3 dont la séquence identifiée par SEQ ID N° 46, est présentée dans la figure 13.

35 Dans la figure 14, l'homologie de séquence entre le clone FBd3 et le rétrovirus HSERV-9 est représentée sur

le tableau matriciel par un trait plein, pour toute homologie partielle supérieure ou égale à 65 %. On peut constater que des homologies existent dans les régions flanquantes du clone (avec le gène pol en 5' et avec le 5 gène env puis le LTR en 3'), mais que la région interne est totalement divergente et ne présente aucune homologie, même faible, avec le gène "env" d'HSERV9. De plus, il apparaît que le clone FBd3 contient une région "env" plus longue que celle qui est décrite pour l'endogène défectif 10 HSERV-9 ; on peut ainsi constater que la région divergente interne constitue un "insert" entre les régions d'homologie partielle avec les gènes défectifs HSERV-9.

15 EXEMPLE 8 : AMPLIFICATION, CLONAGE ET SEQUENCAGE
DE LA REGION DU GENOME RETROVIRAL MSRV-1 SITUEE ENTRE LES
CLONES PSJ17 ET FBd3.

Quatre oligonucléotides, F1, B4, F6 et B1, ont 20 été définis pour amplifier de l'ARN provenant de virions concentrés des souches POL2 et MS7PG. Des réactions de contrôle ont été effectuées de manière à contrôler la présence de contaminants (réaction sur de l'eau). L'amplification consiste en une première étape de RT-PCR 25 selon le protocole décrit dans la demande de brevet EP-A-0 569 272, suivie d'une deuxième étape de PCR effectuée sur 10 µl de produit de la première étape avec des amorces internes à la première région amplifiée (PCR "nichée"). Dans le premier cycle RT-PCR, les amorces 30 F1 et B4 sont utilisées. Dans le deuxième cycle PCR, les amorces F6 et l'amorce B1 sont utilisées. Les amorces sont positionnées comme suit :

	F1	F6	B1	B4	
35	—	—	—	—	
					ARN

MSRV1

PSJ17 -----> 5' pol MSRV-1 5' env.	FBd3 -----/--- 3' pol MSRV-1 /
---	--------------------------------------

Leur composition est :

10 amorce F1 : TGATGTGAAACGGCATACTCACTG (SEQ ID NO 47)
 amorce B4 : CCCAGAGGTTAGGAACCCCTTTC (SEQ ID NO 48)
 amorce F6 : GCTAAAGGAGACTTGTGGTTGTCAG (SEQ ID NO 49)
 amorce B1 : CAACATGGGCATTCGGATTAG (SEQ ID NO 50)

Le produit d'amplification "nichée" obtenu et
 15 dénommé "t pol" est présenté dans la figure 15, et
 correspond à la séquence SEQ ID NO 51.

EXEMPLE 9 : OBTENTION DE NOUVELLES SEQUENCES,
 20 **EXPRIMEES EN ARN DANS LES CELLULES EN CULTURE PRODUISANT
 MSRV-1, ET COMPRENANT UNE REGION "env" DU GENOME
 RETROVIRAL MSRV-1.**

Une banque d'ADNc a été réalisée selon la
 25 procédure décrite par le fabricant des kits
 "cDNA synthesis module, cDNA rapid adaptor ligation
 module, cDNA rapid cloning module, lambda gt10 in vitro
 packaging module" (Amersham, ref RPN1256Y/Z, RPN1712,
 RPN1713, RPN1717, N334Z) à partir de l'ARN messager
 30 extrait de cellules d'une lignée lymphoblastoïde B telle
 que décrite dans l'exemple 2, établie à partir des
 lymphocytes d'un patient atteint de SEP et présentant une
 activité transcriptase inverse détectable selon la
 technique décrite par Perron et coll. (3).
 35 Des oligonucléotides ont été définis pour
 amplifier de l'ADNc cloné dans la banque nucléique entre

la région 3' du clone PSJ17 (pol) et la région 5'(LTR) du clone FBd3. Des réactions de contrôle ont été effectuées de manière à contrôler la présence de contaminants (réaction sur de l'eau). Des réactions PCR effectuées sur 5 les acides nucléiques clonés dans la banque avec différents couples d'amorces ont permis d'amplifier une série clones reliant des séquences pol aux séquences env ou LTR de type MSRV-1.

Deux clones sont représentatifs des séquences 10 obtenues dans la banque de cDNA cellulaire :

- le clone JLBC1, dont la séquence SEQ ID NO 52 est présentée dans la figure 16 ;
- le clone JLBC2, dont la séquence SEQ ID NO 53 est présentée dans la figure 17.

15 Les séquences des clones JLBC1 et JLBC2 sont homologues à celle du clone FBd3, ainsi que cela apparaît dans les figures 18 et 19. L'homologie entre le clone JLBC1 et le clone JLBC2 est représentée dans la figure 20.

Les homologies entre les clones JLBC1 et JLBC2 20 d'une part, et la séquence HSERV9 d'autre part, sont présentées respectivement dans les figures 21 et 22.

On remarque que la région d'homologie entre JLB1, JLB2 et FBd3 comprend, avec quelques variations de séquence et de taille de "l'insert", la séquence 25 supplémentaire absente ("insérée") dans la séquence env HSERV-9, telle que décrite dans l'exemple 8.

On remarque aussi que la région "pol" clonée est très homologue à HSERV-9, ne possède pas de cadre de lecture (en tenant compte des erreurs de séquences 30 induites par les techniques utilisées, jusqu'au séquenceur automatique inclus) et diverge des séquences MSRV-1 obtenues à partir de virions. Etant donné que ces séquences ont été clonées à partir de l'ARN de cellules exprimant des particules MSRV-1, il est probable qu'elles 35 proviennent d'éléments rétroviraux endogènes apparentés à la famille ERV9 ; ce, d'autant plus que les gènes pol et

env sont présent sur un même ARN qui n'est à l'évidence pas l'ARN génomique MSRV1. Certains de ces éléments ERV9 possèdent des LTR fonctionnels activables par des virus réplicatifs codant pour des transactivateurs homologues ou 5 hétérologues. Dans ces conditions, la parenté entre MSRV-1 et HSERV-9 rend probable la transactivation des éléments ERV9 endogènes défectifs (ou non) par des protéines transactivatrices MSRV-1 homologues, voire identiques.

Un tel phénomène peut induire une interférence 10 virale entre l'expression de MSRV-1 et les éléments endogènes apparentés. Une telle interférence conduit généralement à une expression dite "défective-interférente", dont certaines caractéristiques ont été retrouvées dans les cultures étudiées infectées 15 par MSRV-1. De plus, un tel phénomène n'est pas sans générer l'expression de polypeptides, voire de protéines rétrovirales endogènes qui ne sont pas nécessairement tolérées par le système immunitaire. Un tel schéma d'expression aberrante d'éléments endogènes apparentés à 20 MSRV-1 et induite par ce dernier est susceptible de multiplier les antigènes aberrants et, donc, de contribuer à l'induction de processus autoimmuns tels qu'on les observe dans la SEP.

Il est cependant essentiel de noter que les 25 clones JLBC1 et JLBC2 diffèrent de la séquence ERV9 ou HSERV9 déjà décrite, en ce qu'ils possèdent une région env plus longue comprenant une région supplémentaire totalement divergente d'ERV9. On peut donc définir leur parenté avec la famille endogène ERV9, mais ils 30 constituent à l'évidence des éléments originaux, jamais décrits à ce jour. En effet, l'interrogation des banques de données de séquences nucléiques disponibles dans la version n° 15 (1995) du logiciel "Entrez" (NCBI, NIH, Bethesda, USA) n'a pas permis d'identifier de séquence 35 homologue connue dans la région env de ces clones.

EXEMPLE 10 : OBTENTION DES SEQUENCES SITUÉES DANS LA REGION 5' pol et 3' gag DU GENOME RETROVIRAL MSRV-1.

Ainsi que cela a déjà été décrit dans 5 l'exemple 5, une technique PCR dérivée de la technique publiée par Frohman (19) a été utilisée. La technique dérivée permet, à l'aide d'une amorce spécifique en 3' du génome à amplifier, d'élonguer la séquence vers la région 5' du génome à analyser. Cette variante technique 10 est décrite dans la documentation de la firme "Clontech Laboratories Inc., (Palo-Alto California, USA) fournie avec son produit "5'-AmpliFINDER™ RACE Kit", qui a été utilisé sur une fraction de virion purifié comme décrit précédemment.

15 Afin de réaliser une amplification de la région 5' du génome rétroviral MSRV-1 partant de la séquence pol déjà séquencée (clone F11-1) et s'étendant vers le gène gag, des amorces spécifiques MSRV-1 ont été définies.

20 Les amorces 3' spécifiques utilisées dans le protocole du kit pour la synthèse du ADNc et l'amplification PCR sont respectivement complémentaires aux séquences MSRV-1 suivantes :

25 ADNc : (SEQ ID NO 54)
CCTGAGTTCTTGCACAAACCC
amplification : (SEQ ID NO 55)
GTCCGTTGGGTTTCCTTACTCCT

30 Les produits issus de la PCR ont été extraits après purification sur gel d'agarose selon les méthodes conventionnelles (17), puis resuspendus dans 10 ml d'eau distillée. Une des propriétés de la polymérase Taq consistant à ajouter une adénine à l'extrémité 3' de chacun 35 des deux brins d'ADN, l'ADN obtenu a été directement inséré dans un plamide à l'aide du kit TA Cloning™

(British Biotechnology). Les 2 µl de solution d'ADN ont été mélangés avec 5 µl d'eau distillée stérile, 1 µl d'un tampon de ligation 10 fois concentré "10X LIGATION BUFFER", 2 µl de "pCR™ VECTOR" (25 ng/ml) et 1 µl de "TA DNA LIGASE". Ce mélange a été incubé une nuit à 12°C. Les étapes suivantes ont été réalisées conformément au instructions du kit TA Cloning® (British Biotechnology). A la fin de la procédure, les colonies blanches de bactéries recombinantes (white) ont été repiquées pour être cultivées et permettre l'extraction des plasmides incorporés selon la procédure dite de "miniprep" (17). La préparation de plasmide de chaque colonie recombinante a été coupée par une enzyme de restriction appropriée et analysée sur gel d'agarose. Les plasmides possédant un insert détecté sous lumière UV après marquage du gel au bromure d'éthidium, ont été sélectionnés pour le séquençage de l'insert, après hybridation avec une amorce complémentaire du promoteur Sp6 présent sur le plasmide de clonage du TA Cloning Kit®.

La réaction préalable au séquençage a ensuite été effectuée selon la méthode préconisée pour l'utilisation du kit de séquençage "Prism ready reaction kit dye deoxyterminator cycle sequencing kit" (Applied Biosystems, ref. 401384) et le séquençage automatique a été réalisé avec l'appareil "automatic sequencer, modèle 373 A Applied Biosystems selon les instructions du fabricant.

Cette approche technique a été appliquée à un échantillon de virion concentré comme décrit ci-après, à partir d'un mélange de surnageants de culture produits par des lignées lymphoblastoïdes B telles que décrites dans l'exemple 2, établies à partir des lymphocytes de patients atteints de SEP et présentant une activité transcriptase inverse détectable selon la technique décrite par Perron et coll. (3) : les surnageants de cultures sont collectés deux fois par semaine, pré-centrifugés à 10 000 trs/min pendant 30 minutes pour éliminer les débris cellulaires,

et ensuite, congelés à -80°C ou utilisés tels quels pour les étapes suivantes. Les surnageants frais ou décongelés sont centrifugés sur un coussin de PBS-glycérol 30 % à 100 000g pendant 2 h à 4°C. Après élimination du 5 surnageant, le culot sédimenté constitue l'échantillon de virions concentrés, mais non purifiés. Le culot ainsi obtenu est alors repris dans un petit volume d'un tampon adéquat pour l'extraction d'ARN. La réaction de synthèse de ADNc mentionnée plus haut est réalisée sur cet ARN 10 extrait de virion extracellulaire concentré.

L'amplification RT-PCR selon la technique citée plus-haut a permis d'obtenir le clone GM3 dont la séquence identifiée par SEQ ID NO 56, est présentée dans la figure 23.
15 Dans la figure 24, l'homologie de séquence entre le clone GMP3 et le rétrovirus HSERV-9 est représentée sur le tableau matriciel par un trait plein, pour toute homologie partielle supérieure ou égale à 65 %.

En synthèse, sur la figure 25 est représentée la 20 localisation des différents clones précédemment étudiés, par rapport au génome ERV9 connu. Sur la figure 25, la région env MSRV-1 étant plus longue que le gène env de ERV9 de référence, la région supplémentaire est représentée au-dessus du point d'insertion selon un "V", 25 étant entendu que le matériel inséré présente une variabilité de séquences et de taille entre les clones représentés (JLBc1, JLBc2, FBd3). Et sur la figure 26, est représentée la position de différents clones étudiés dans la région MSRV-1 pol *.

30 Grâce au clone GM3 précédemment décrit, on a pu définir un cadre de lecture possible, couvrant l'ensemble du gène pol, référencé selon SEQ ID NO 57, représenté aux figures successives 27a à 27c.

**EXEMPLE 11 : DETECTION D'ANTICORPS SPECIFIQUES
ANTI-MSRV-1 DANS LE SERUM HUMAIN.**

L'identification de la séquence du gène pol du rétrovirus MSRV-1 et d'un cadre de lecture ouverte de ce gène a permis de déterminer la séquence SEQ ID NO 39 en acides aminés d'une région dudit gène, référencée SEQ ID NO 40 (cf figure 12).

Différents peptides synthétiques correspondant à des fragments de la séquence protéique de la transcriptase inverse MSRV-1 codée par le gène pol, ont été testés pour leur spécificité antigénique vis à vis de sera de patients atteints de SEP et de témoins sains.

Les peptides ont été synthétisés chimiquement par synthèse en phase solide, selon la technique de Merrifield (Barany G, and Merrifield R.B, 1980, In the Peptides, 2, 1-284, Gross E and Meienhofer J, Eds Academic Press, New York). Les modalités pratiques sont celles décrites ci-après.

20 a) Synthèse des peptides:

Les peptides ont été synthétisés sur une résine phénylacétamidométhyle (PAM) /polystyrène/divinylbenzène (Applied Biosystems, Inc. Foster City, CA), en utilisant un synthétiseur automatique "Applied Biosystems 430A". Les acides aminés sont couplés sous forme d'esters d'hydroxybenzotriazole (HOBT). Les acides aminés utilisés proviennent de Novabiochem (Lauflelfingen, Suisse) ou de Bachem (Bubendorf, Suisse).

La synthèse chimique a été effectuée en utilisant un protocole de double couplage avec la N-méthyl-pyrrolidone (NMP) comme solvant. Les peptides ont été coupés de la résine ainsi que les protections latérales, de manière simultanée, à l'aide d'acide fluorhydrique (HF) dans un appareil approprié (appareil de coupure de type I, Peptide Institute, Osaka, Japon).

Pour 1g de peptidylrésine, 10ml de HF, 1ml d'anisole et 1ml de diméthylsulfure 5DMS sont utilisés. Le mélange est agité durant 45 minutes à -2°C. Le HF est alors évaporé sous vide. Après lavages intensifs à 5 l'éther, le peptide est élué de la résine par de l'acide acétique 10%, puis lyophilisé.

Les peptides sont purifiés par chromatographie liquide haute performance préparative sur une colonne VYDAC de type C18 (250 x 21 mm) (The Separation Group, 10 Hesperia, CA, USA). L'élution est réalisée par un gradient d'acetonitrile à un débit de 22 ml/min. Les fractions collectées sont contrôlées par une élution en condition isocratique sur une colonne VYDAC®. C18 analytique (250 x 4,6 mm), à un débit de 1ml/min. Les fractions qui 15 présentent le même temps de rétention sont réunies et lyophilisées. La fraction majoritaire est ensuite analysée par chromatographie liquide haute performance analytique, avec le système décrit précédemment. Le peptide qui est considéré comme de pureté acceptable se traduit par un pic 20 unique représentant 95 % minimum du chromatogramme.

Les peptides purifiés sont ensuite analysés dans le but de contrôler leur composition en acides aminés, à l'aide d'un analyseur d'acides aminés automatique Applied Biosystems 420H. La mesure de la masse moléculaire 25 chimique (moyenne) des peptides est obtenue en utilisant la spectrométrie de masse L.S.I.M.S. en mode d'ion positif sur un instrument à double focalisation VG. ZAB.ZSEQ relié à un système d'acquisition DEC-VAX 2000 (VG analytical Ltd, Manchester, Angleterre).

30 La réactivité des différents peptides a été testée contre des sera de patients atteints de sclérose en plaques et contre des sera de témoins sains. Ceci a permis de sélectionner un peptide dénommé POL2B dont la séquence est représentée à la figure 28 dans l'identificateur 35 SEQ ID NO 39 ci-dessous, codé par le gène pol de MSRV-1 (nucléotides 181 à 330).

b) Propriétés antigéniques :

Les propriétés antigéniques du peptide POL2B ont été mises en évidence selon le protocole ELISA décrit ci-dessous.

5 Le peptide POL2B lyophilisé a été dissous dans de l'eau distillée stérile à une concentration de 1mg/ml. Cette solution-mère a été aliquotée et gardée à +4°C pour usage sous quinzaine, ou congelée à -20°C, pour un usage dans les 2 mois. Un aliquot est dilué dans une solution de
10 PBS (Phosphate Buffer Saline) afin d'obtenir une concentration finale de peptide de 1 microgramme/ml. 100 microlitres de cette dilution sont déposés dans chaque puits de plaques de microtitration (plastique "high-binding", COSTAR ref: 3590). Les plaques sont
15 recouvertes d'un adhésif de type "plate-sealer" et maintenues une nuit à +4°C, pour la phase d'adsorption du peptide sur le plastique. L'adhésif est enlevé et les plaques sont lavées trois fois avec un volume de 300 microlitres d'une solution A (PBS 1x, 0,05% Tween 20®),
20 puis retournées sur un tissu absorbant. Les plaques ainsi égouttées sont remplies avec 200 microlitres par puits d'une solution B (solution A + 10 % de sérum de chèvre), puis recouvertes d'un adhésif et incubées de 45 minutes à 1 heure, à 37°C. Les plaques sont ensuite lavées trois
25 fois avec la solution A, comme décrit précédemment.

Les échantillons de sérum à tester sont préalablement dilués au 1/50ème dans la solution B et 100 microlitres de chaque sérum dilué à tester sont déposés dans les puits de chaque plaque de microtitration.
30 Un contrôle négatif est déposé dans un puits de chaque plaque, sous la forme de 100 microlitres de tampon B. Les plaques recouvertes d'un adhésif sont alors incubées 1 à 3 heures, à 37°C. Les plaques sont ensuite lavées trois fois avec la solution A, comme décrit précédemment.
35 Parallèlement, un anticorps de chèvre marqué à la peroxydase et dirigé contre les IgG (Sigma Immunochemicals

ref. A6029) ou les IgM (Cappel ref.: 55228) humaines est dilué dans la solution B (dilution 1/5000 pour l'anti-IgG et, 1/1000 pour l'anti-IgM). 100 microlitres de la dilution adéquate de l'anticorps marqué sont alors déposés 5 dans chaque puits des plaques de microtitration et les plaques recouvertes d'un adhésif sont incubées 1 à 2 heures, à 37°C. Un nouveau lavage des plaques est ensuite effectué comme décrit précédemment. Parallèlement, le substrat de la peroxydase est préparé selon les 10 indications du kit "Sigma fast OPD kit" (Sigma Immunochemicals, ref. P9187). 100 microlitres de solution-substrat sont déposés dans chaque puits et les plaques sont placées à l'abri de la lumière pendant 20 à 30 minutes, à température ambiante.

15 Une fois la réaction colorée stabilisée, les plaques sont immédiatement placées dans un lecteur spectrophotométrique de plaques ELISA, et la densité optique (D.O.) de chaque puits est lue à une longueur d'onde de 492 nm. Alternativement, 30 microlitres d'HCL 1N 20 sont déposés dans chaque puits pour stopper la réaction et les plaques sont lues au spectrophotomètre dans les 24 heures.

Les échantillons sérologiques sont déposés en double ou en triple et la densité optique (D.O.) 25 correspondant au sérum testé est calculée en faisant la moyenne des D.O. obtenues pour un même échantillon, à la même dilution.

La D.O. nette de chaque sérum correspond à la D.O. moyenne du sérum de laquelle est soustraite la D.O. 30 moyenne du témoin négatif (solution B : PBS, Tween 20®, 0,05%, 10% sérum de chèvre).

c) Détection d'anticorps IgG anti-MSRV-1 par ELISA :

La technique décrite ci-dessus a été utilisée 35 avec le peptide POLB2 pour rechercher la présence d'anticorps IgG spécifiques anti-MSRV-1 dans le sérum de

29 patients, pour lesquels un diagnostic certain ou probable de SEP a été posé selon les critères de Poser (23), et de 32 témoins sains (donneurs de sang).

Dans la figure 29, les résultats de chaque sérum testé avec un anticorps anti-IgG, sont représentés. Chaque barre verticale représente la densité optique (D.O à 492 nm) nette d'un sérum testé. L'axe des ordonnées indique la D.O. nette au sommet des barres verticales. Les 29 premières barres verticales situées à gauche de la ligne pointillée verticale, représentent les sera de 29 cas de SEP testés et les 32 barres verticales situées à droite de la ligne pointillée verticale, représentent les sera de 32 témoins sains (donneurs de sang).

La moyenne des D.O. nettes des SEP testées est de : 0,62. Le graphique permet de visualiser 5 témoins dont la D.O. nette émerge au dessus des valeurs groupées de la population témoin. Ces valeurs peuvent représenter la présence d'IgG spécifiques chez des patients séropositifs non-malades. Deux méthodes ont donc été évaluées pour déterminer le seuil statistique de positivité du test.

La moyenne des D.O. nettes des témoins, y compris les témoins avec des D.O. nettes élevées, est de 0,36. Sans les 5 témoins dont les D.O. nettes sont supérieures ou égales à 0,5, la moyenne des témoins "négatifs" est de 0,33. L'écart type des témoins négatifs est de 0,10. Un seuil de positivité théorique peut être calculé selon la formule :

30 valeur seuil (moyenne des D.O. nettes des témoins séronégatifs) + (2 ou 3 x écart-type des D.O. nettes des témoins séronégatifs).

Dans le premier cas, on considère qu'il existe des séropositifs non-malades et la valeur seuil est égale à : 0,33 + (2 x 0,10) = 0,53. Les résultats négatifs

représentent un "bruit de fond" non spécifique de la présence d'anticorps spécifiquement dirigés contre un épitope du peptide.

Dans le deuxième cas, si l'ensemble des témoins 5 constitués de donneurs de sang en bonne santé apparente est pris comme base de référence, sans exclure les sérum a priori séropositifs, l'écart-type des "témoins non-SEP" est de 0,116. La valeur seuil devient alors : 0,36 + (2 x 0,116) = 0,59.

10 Selon cette analyse, le test est spécifique de la SEP. A cet égard, on constate que le test est spécifique de la SEP, puisque comme montré dans le tableau 1, aucun témoin n'a une D.O. nette au-dessus de ce seuil. En fait ce résultat reflète le fait que les titres d'anticorps 15 chez les patients atteints de SEP sont en majorité plus élevés que chez des témoins sains ayant été en contact avec MSRV-1.

TABLEAU N° 1

	SEP	TEMOINS
	0,681	0,3515
	1,0425	0,56
	0,5675	0,3565
	0,63	0,449
	0,588	0,2825
	0,645	0,55
	0,6635	0,52
	0,576	0,2535
	0,7765	0,55
	0,5745	0,51
	0,513	0,426
	0,4325	0,451
	0,7255	0,227
	0,859	0,3905
	0,6435	0,265
	0,5795	0,4295
	0,8655	0,291
	0,671	0,347
	0,596	0,4495
	0,662	0,3725
	0,602	0,181
	0,525	0,2725
	0,53	0,426
	0,565	0,1915
	0,517	0,222
	0,607	0,395
	0,3705	0,34
	0,397	0,307
	0,4395	0,219
		0,491
		0,2265
		0,2605
MOYENNE	0,62	0,33
ECART TYPE	0,14	0,10
VALEUR SEUIL		0,53

En fonction du premier mode de calcul et comme représenté à la figure 29 et dans le tableau correspondant 1, 26 des 29 sérum SEP donnent un résultat positif (D.O. nette supérieure ou égale à 0,50) indiquant 5 la présence d'IgG spécifiquement dirigées contre le peptide POL2B, donc contre une partie de l'enzyme transcriptase inverse du rétrovirus MSRV-1 codée par son gène pol et, par conséquent, contre le rétrovirus MSRV-1. Ainsi, environ 90 % des patients SEP testés ont réagi 10 contre un épitope porté par le peptide POL2B et présentent des IgG circulantes dirigées contre ce dernier.

Cinq donneurs de sang, en apparence bonne santé, sur 32 présentent un résultat positif. Ainsi, il apparaît qu'environ 15 % de la population non-malade peut avoir été 15 en contact d'un épitope porté par le peptide POL2B dans des conditions ayant conduit à une immunisation active qui se traduit par la persistance d'IgG sériques spécifiques. Ces conditions sont compatibles avec une immunisation contre la transcriptase inverse du rétrovirus MSRV-1, lors 20 d'une infection par le (et/ou réactivation du) rétrovirus MSRV-1. L'absence de pathologie neurologique apparente évoquant la SEP chez ces témoins séropositifs peut indiquer qu'ils sont porteurs sains, ont éliminé un virus infectieux après s'être immunisés ou qu'ils constituent 25 une population à risque de porteurs chroniques. En effet, les données épidémiologiques montrant qu'un agent pathogène présent dans l'environnement des régions à haute prévalence de SEP, peut être la cause de cette maladie, impliquent qu'une fraction de la population exempte de SEP 30 a nécessairement été en contact avec un tel agent pathogène. On a montré que le rétrovirus MSRV-1 constitue tout ou partie de cet "agent pathogène" à l'origine de la SEP et il est donc normal que des témoins pris dans une population saine présentent des anticorps de type IgG 35 contre des composants du rétrovirus MSRV-1. Ainsi, la différence de séroprévalence entre les SEP et la

population témoin est extrêmement significative : test "chi-2", $p<0,001$. Ces résultats sont donc en faveur d'un rôle étiopathogénique de MSRV-1 dans la SEP.

d) Détection d'anticorps IgM anti-MSRV1 par ELISA :

La technique ELISA avec le peptide POL2B a été utilisée pour rechercher la présence d'anticorps spécifiques IgM anti-MSRV-1 dans le sérum de 36 patients, pour lesquels un diagnostic certain ou probable de SEP a été posé selon les critères de Poser (23), et de 42 témoins sains (donneurs de sang).

Dans la figure 30, les résultats de chaque sérum testé avec un anticorps anti-IgM, sont représentés. Chaque barre verticale représente la densité optique (D.O à 492 nm) nette d'un sérum testé. L'axe des ordonnées indique la D.O. nette au sommet des barres verticales. Les 36 premières barres verticales situées à gauche de la ligne verticale coupant l'axe des abscisses représentent les sérums de 36 cas de SEP testés et les barres verticales situées à droite de la ligne pointillée verticale, représentent les sérums de 42 témoins sains (donneurs de sang). La ligne horizontale tracée au milieu du graphique représente un seuil théorique délimitant les résultats positifs (dont le sommet de la barre est situé au dessus) et les résultats négatifs (dont le sommet de la barre est situé au dessous).

La moyenne des D.O. nettes des SEP testées est de : 0,19.

La moyenne des D.O. nettes des témoins est de : 0,09.

L'écart type des témoins négatifs est de : 0,05.

Etant donné la faible différence entre la moyenne et l'écart-type des témoins, le seuil de positivité théorique peut être calculé selon la formule :

5 valeur seuil = (moyenne des D.O. nettes des témoins séronégatifs) + (3 x écart-type des D.O. nettes des témoins séronégatifs).

La valeur seuil est donc égale à 0,09+
10 (3 x 0,05) = 0,26 ; soit, en pratique, 0,25.

Les résultats négatifs représentent un "bruit de fond" non spécifique de la présence d'anticorps spécifiquement dirigés contre un épitope du peptide.

Selon cette analyse et comme montré à la
15 figure 30 et dans le tableau 2 correspondant, le test IgM est spécifique de la SEP, puisqu'aucun témoin n'a une D.O. nette au-dessus du seuil. 7 des 36 sérum SEP produisent un résultat IgM positif ; or l'étude des données cliniques révèle que ces sérum positifs ont été prélevés lors d'une
20 première poussée de SEP ou d'une poussée aigüe chez des malades non-traités. Il est connu que les IgM dirigées contre des agents pathogènes sont produites lors des primo-infections ou lors de réactivations suivant une phase de latence dudit agent pathogène.

25 La différence de séroprévalence entre les SEP et la population témoin est extrêmement significative : test "chi-2", $p < 0,001$.

Ces résultats sont en faveur d'un rôle étiopathogénique de MSRV-1 dans la SEP.

30 La détection des anticorps IgM et IgG contre le peptide POL2B permet d'évaluer l'évolution d'une infection par MSRV-1 et/ou de la réactivation virale de MSRV-1.

TABLEAU N° 2

	SEP	TEMOINS
	0,064	0,243
	0,087	0,11
	0,044	0,098
	0,115	0,028
	0,089	0,094
	0,025	0,038
	0,097	0,176
	0,108	0,146
	0,018	0,049
	0,234	0,161
	0,274	0,113
	0,225	0,079
	0,314	0,093
	0,522	0,127
	0,306	0,02
	0,143	0,052
	0,375	0,062
	0,142	0,074
	0,157	0,043
	0,168	0,046
	1,051	0,041
	0,104	0,13
	0,187	0,153
	0,044	0,107
	0,053	0,178
	0,153	0,114
	0,07	0,078
	0,033	0,118
	0,104	0,177
	0,187	0,026
	0,044	0,024
	0,053	0,046
	0,153	0,116
	0,07	0,04
	0,033	0,028
	0,973	0,073
		0,008
		0,074
		0,141
		0,219
		0,047
		0,017
MOYENNE	0,19	0,09
ECART TYPE	0,23	0,05
VALEUR SEUIL		0,26

e) Recherche d'épitopes immunodominants dans le peptide POL2B :

Afin de réduire le bruit de fond non-spécifique et d'optimiser la détection des réponses des anticorps 5 anti-MSRV-1, la synthèse d'octapeptides, successivement décalés d'un aminoacide, couvrant l'ensemble de la séquence déterminée par POL2B, a été réalisée selon le protocole décrit ci-dessous.

La synthèse chimiques d'octapeptides chevauchants 10 couvrant la séquence en acides aminés 61-110 représentée dans l'identificateur SEQ ID NO 39 a été réalisée sur membrane de cellulose activée selon la technique de BERG et al. (1989. J. Ann. Chem. Soc., 111, 8024-8026) commercialisée par Cambridge Research Biochemicals sous la 15 dénomination commerciale Spotscan. Cette technique permet la synthèse simultanée d'un grand nombre de peptides et leur analyse.

La synthèse est réalisée avec des acides aminés estérifiés dont le groupement a-aminé est protégé par un 20 groupement Fmoc (Nova Biochem) et les groupements latéraux par des groupements protecteurs tels que trityl, t-butyl ester ou t-butyl éther. Les acides aminés estérifiés sont solubilisés dans du N-methyl pyrrolidone (NMP) à la concentration de 300 nM, et 0,9 µl sont déposés au niveau 25 de taches de dépôt de bleu de bromophénol. Après incubation de 15 minutes, un nouveau dépôt d'acides aminés est réalisé suivi d'une autre incubation de 15 minutes. Si le couplage entre deux acides aminés s'est effectué correctement on observe une modification de coloration 30 (passage du bleu au vert-jaune). Après trois lavages dans du DMF, une étape d'acétylation est effectuée par de l'anhydride acétique. Ensuite, les groupements aminés terminaux des peptides en cours de synthèse sont déprotégés par de la pipéridine 20 % dans le DMF. Les 35 taches de dépôt sont recolorées par une solution de bleu de bromophénol à 1 % dans le DMF, lavées trois fois au

méthanol et séchées. L'ensemble de ces opérations constitue un cycle d'addition d'un acide aminé et ce cycle est répété jusqu'à l'achèvement de la synthèse. Lorsque tous les acides aminés ont été ajoutés, le groupement 5 NH₂-terminal du dernier acide aminé est déprotégé par de la pipéridine à 20 % dans le DMF et acétylé par de l'anhydride acétique. Les groupements protecteurs de la chaîne latérale sont enlevés par un mélange de dichlorométhane/acide trifluoroacétique/triisobutylsilane 10 (5ml/5ml/250μl). L'immunoréactivité des peptides est ensuite testée par ELISA.

Après synthèse en double des différents octapeptides sur deux membranes différentes, ces dernières sont rincées avec du méthanol et lavées dans du TBS 15 (Tris 0,1M pH 7,2), puis incubées une nuit à température ambiante dans un tampon de saturation. Après plusieurs lavages dans du TBS-T (Tris 0,1M pH 7,2 - 0,05% Tween 20), une membrane est incubée avec une dilution au 1/50 d'un sérum de référence provenant d'un patient atteint de SEP 20 et l'autre membrane avec une dilution au 1/50 d'un pool de sérums de témoins sains. Les membranes sont incubées 4 heures à température ambiante. Après lavages avec du TBS-T, un conjugué anti-immunoglobulines humaines marqué à la b-galactosidase (commercialisé par Cambridge Research 25 Biomedicals) est ajouté à une dilution au 1/200 et l'ensemble est incubé deux heures à température ambiante. Après lavages des membranes par du TBS-T 0,05% et du PBS, l'immunoréactivité au niveau des différentes taches est révélée par addition de 5-bromo-4-chloro-3-indoyl-b-D- 30 galactopyranoside dans du potassium. L'intensité de coloration des taches est estimée qualitativement avec une valeur relative de 0 à 5 comme représenté aux figures 31 à 33 annexées.

On peut ainsi déterminer deux régions 35 immunodominantes à chaque extrémité du peptide POL2B correspondant respectivement aux séquences en acides

aminés 65-75 (SEQ ID NO 41) et 92-109 (SEQ ID NO 42), selon figure 34, et comprises respectivement entre les octapeptides Phe-Cys-Ile-Pro-Val-Arg-Pro-Asp (FCIPVRPD) et Arg-Pro-Asp-Ser-Gln-Phe-Leu-Phe (RPDSQFLF), et, Thr-Val-
5 Leu-Pro-Gln-Gly-Phe-Arg (TVLPQGFR) et Leu-Phe-Gly-Gln-Ala-
Leu-Ala-Gln (LFGQALAQ) et une région moins réactive, mais
apparemment plus spécifique, puisqu'elle ne produit aucun
bruit de fond avec le sérum témoin, représentée par les
octapeptides Leu-Phe-Ala-Phe-Glu-Asp-Pro-Leu (LFAFEDPL)
10 (SEQ ID NO 43) et Phe-Ala-Phe-Glu-Asp-Pro-Leu-Asn
(FAFEDPLN) (SEQ ID NO 44).

Ces régions permettent de définir de nouveaux peptides plus spécifiques et plus immunoréactifs selon les techniques habituelles.

15 Il est ainsi possible, grâce aux découvertes effectuées et aux méthodes mises au point par les inventeurs, de réaliser un diagnostic de l'infection et/ou de la réactivation MSRV-1, et d'évaluer une thérapie dans la SEP sur la base de son efficacité à "negativer" la
20 détection de ces agents dans les fluides biologiques des patients. De plus, la détection précoce chez des personnes ne présentant pas encore de signes neurologiques de SEP, pourrait permettre d'instaurer un traitement d'autant plus efficace sur l'évolution clinique ultérieure qu'il
25 précèderait le stade lésionnel qui correspond à l'apparition des troubles neurologiques. Or, à ce jour, un diagnostic de SEP ne peut être établi avant l'installation d'une symptomatologie neurologique lésionnelle et, donc, aucun traitement n'est instauré avant l'émergence d'une
30 clinique évocatrice de lésions du système nerveux central déjà conséquentes. Le diagnostic d'une infection et/ou réactivation de MSRV-1 et/ou MSRV-2 chez l'homme est donc déterminant et la présente invention en fournit les moyens.

35 Il est ainsi possible, outre de réaliser un diagnostic de l'infection et/ou de la réactivation MSRV-1,

d'évaluer une thérapie dans la SEP sur la base de son efficacité à "négativer" la détection de ces agents dans les fluides biologiques des patients.

BIBLIOGRAPHIE

(1) Norrby E., Prog. Med. Virol., 1978; 24, 1-39.

(2) Johnson R.T., "Handbook of clinical neurology, 47 Demyelinating diseases", Vinken P. et Bruyn G.W., eds. Amsterdam, Elsevier Science Publishing, 1985, 319-336.

5 (3) Perron H. et coll., Res. Virol. 1989, 140, 551-561.

(4) Perron H. et coll., "Current concepts in multiple sclerosis" Wiethölter et coll., eds. Amsterdam, Elsevier, 1991, 111-116.

10 (5) Perron H. et coll., The Lancet 1991, 337, 862-863.

(6) Perron H. et coll., J. Gen. Virol. 1993, 74, 65-72.

(7) Fields et Knipe, Fondamental Virology 1986, Rev Press N.Y.

(8) Nielsen P.E. et coll, Science 1991; 254, 1497-1500.

15 (9) Maniatis et al, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, 1982.

(10) Southern E.M., J. Mol. Biol. 1975, 98, 503.

(11) Dunn A.R. et Hassel J.A., Cell 1977, 12, 23.

(12) Shih et coll., J. Virol. 1989, 63, 64-75.

20 (13) Perron H. et coll., Res. Vir. 1992, 143, 337-350.

(14) Meyerhans et coll., Cell 1989, 58, 901-910.

(15) Linial M.L. and Miller A.D., "Current topics in microbiology and immunobiology. Retroviruses, strategies of replication" vol. 157, 125-152;

25 Swanstrom R. et Vogt P.K., éditeurs, Springer-Verlag, Heidelberg 1990.

(16) Lori F. et coll., J. Virol. 1992, 66, 5067-5074.

(17) Sambrook J., Fritsch E.F., et Maniatis T., Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor 30 Laboratory Press, 1989.

(18) La Mantia et coll., Nucleic Acids Research 1991, 19, 1513-1520.

(19) Frohman et coll., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988, 85, 8998-9002.

35 (20) Chomzynski P. et N. Sacchi, Analytical Biochemistry 1987, 162, 156-159.

(21) **F. Mallet et coll.**, Journal of Clinical Microbiology 1993; 31, 1444-1449.

(22) **G. Barany and R.B. Merrifield**, 1980, In the Peptides, 2, 1-284, Gross E and Meienhofer J, Eds Academic Press, New York.

(23) **Poser et al**, Gbers G.C. eds. The diagnosis of multiple sclerosis Thieme Stratton Inc, New York 1984 : 225-229.

(24) **La Mantia et coll.**, Nucleic Acid Research 1989, 17, 10 5913-22.

REVENDICATIONS

1/ Matériel viral, à l'état isolé ou purifié, dont le génome comprend une séquence nucléotidique choisie dans le groupe incluant les séquences SEQ ID NO 46, SEQ ID NO 51, SEQ ID NO 52, SEQ ID NO 53 et SEQ ID NO 56, leurs séquences complémentaires, et leurs séquences équivalentes, notamment les séquences nucléotidiques présentant, pour toute suite de 100 monomères contigus, au moins 50 % et préférentiellement au moins 70 % d'homologie avec respectivement lesdites séquences SEQ ID NO 46, SEQ ID NO 51, SEQ ID NO 52, SEQ ID NO 53 et SEQ ID NO 56, et leurs séquences complémentaires.

2/ Matériel viral, à l'état isolé ou purifié, dont la région du génome comprenant les gènes env, pol et une partie du gène gag, à l'exclusion de la sous-région ayant une séquence identique ou équivalente à SEQ ID NO 1, code pour tout polypeptide présentant, pour toute suite contigue d'au moins 30 acides aminés, au moins 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec une séquence peptidique codée par toute séquence nucléotidique choisie dans le groupe incluant SEQ ID NO 46, SEQ ID NO 51, SEQ ID NO 52, SEQ ID NO 53 et SEQ ID NO 56, et leurs séquences complémentaires.

3/ Matériel viral, à l'état isolé ou purifié, dont le gène pol comprend une séquence nucléotidique identique ou équivalente, partiellement ou totalement, à SEQ ID NO 57, à l'exclusion de SEQ ID NO 1.

4/ Fragment nucléotidique comprenant une séquence nucléotidique choisie dans le groupe incluant :

- 30 (a) toutes les séquences génomiques, partielles et totale, du gène pol du virus MSRV-1, sauf la séquence totale du fragment nucléotidique défini par SEQ ID NO 1 ;
- (b) toutes les séquences génomiques, partielles et totales, du gène env de MSRV-1 ;

(c) toutes les séquences génomiques chevauchant le gène pol et le gène env du virus MSRV-1, et chevauchant le gène pol et le gène gag ;

(d) toutes les séquences, partielles et totale, d'un clone
5 choisi dans le groupe incluant les clones FBd3 (SEQ ID NO 46), t pol (SEQ ID NO 51), JLBC1 (SEQ ID NO 52), JLBC2 (SEQ ID NO 53), GM3 (SEQ ID NO 56), à l'exclusion de toute séquence nucléotidique identique à ou comprise dans la séquence
10 définie par SEQ ID NO 1 ;

(e) les séquences complémentaires auxdites séquences génomiques ;

(f) les séquences équivalentes auxdites séquences (a) à (e), notamment les séquences nucléotidiques
15 présentant, pour toute suite de 100 monomères contigus, au moins 50 % et de préférence au moins 70 % d'homologie avec lesdites séquences (a) à (e).

5/ Fragment selon la revendication 4, comprenant une séquence nucléotidique identique à une séquence
une génomique partielle ou totale du gène pol du virus MSRV-1,
20 sauf à la séquence totale du fragment nucléotidique défini par SEQ ID NO 1, ou identique à toute séquence équivalente à ladite séquence génomique partielle ou totale, notamment homologue à cette dernière.

25 6/ Fragment nucléotidique selon la revendication 5, comprenant une séquence nucléotidique codante, partiellement ou totalement identique à une séquence nucléotidique choisie dans le groupe incluant :
- la séquence nucléotidique définie par SEQ ID NO 40 ;
30 - les séquences complémentaires à SEQ ID NO 40 ;
- les séquences équivalentes et notamment homologues à SEQ ID NO 40 ;
- les séquences codant pour tout ou partie de la séquence peptidique définie par SEQ ID NO 39 ;
35 - les séquences codant pour tout ou partie d'une séquence peptidique équivalente, notamment homologue à

SEQ ID NO 39, susceptible d'être reconnue par des sera de patients infectés par le virus MSRV-1, ou chez lesquels le virus MSRV-1 a été réactivé.

7/ Fragment selon la revendication 4, comprenant
5 une séquence nucléotidique identique à une séquence génomique partielle ou totale du gène env du virus MSRV-1, ou identique à toute séquence complémentaire de ladite séquence nucléotidique, ou identique à toute séquence équivalente à ladite séquence nucléotidique, notamment
10 homologue à cette dernière.

8/ Fragment selon la revendication 4, comprenant une séquence nucléotidique identique à une séquence partielle ou totale d'un clone choisi dans le groupe incluant les clones FBd3 (SEQ ID NO 46),
15 t pol (SEQ ID NO 51) JLBC1 (SEQ ID NO 52), JLBC2 (SEQ ID NO 53) GM3 (SEQ ID NO 56), à l'exclusion de toute séquence nucléotidique identique à ou comprise dans la séquence définie par SEQ ID NO 1.

9/ Sonde nucléique de détection d'un agent
20 pathogène et/ou infectant associé à la sclérose en plaques, caractérisée en ce qu'elle est susceptible de s'hybrider spécifiquement sur tout fragment selon l'une quelconque des revendications 4 à 8, appartenant ou compris dans le génome dudit agent pathogène.

25 10/ Amorce pour l'amplification par polymérisation d'un ARN ou d'un ADN d'un matériel viral, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence nucléotidique identique ou équivalente à au moins une partie de la séquence nucléotidique d'un fragment selon
30 l'une quelconque des revendications 4 à 8, notamment une séquence nucléotidique présentant pour toute suite de 10 monomères contigus, au moins 70 % d'homologie avec au moins ladite partie dudit fragment.

11/ Amorce selon la revendication 10,
35 caractérisée en ce que sa séquence nucléotidique est identique à l'une quelconque des séquences choisies dans

le groupe incluant SEQ ID NO 47 à SEQ ID NO 50,
SEQ ID NO 55.

5 12/ ARN ou ADN, et notamment vecteur de réPLICATION, comprenant un fragment génomique du matériel viral selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, ou un fragment selon l'une quelconque des revendications 4 à 8.

10 13/ Peptide codé par tout cadre de lecture ouvert appartenant à un fragment nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 4 à 8, notamment polypeptide, par exemple oligopeptide formant ou comprenant un déterminant antigénique reconnu par des sera de patients infectés par le virus MSRV-1, et/ou chez lesquels le virus MSRV-1 a été réactivé.

15 14/ Polypeptide antigénique selon la revendication 13, caractérisé en ce que le cadre de lecture ouvert le codant commence, dans le sens 5'-3', au nucléotide 181, et finit au nucléotide 330 de SEQ ID NO 1.

20 15/ Polypeptide, notamment oligopeptide antigénique reconnu des sera de patients infectés par le virus MSRV-1, et/ou chez lesquels le virus MSRV-1 a été réactivé, caractérisé en ce que sa séquence peptidique est identique, partiellement ou totalement, ou équivalente à la séquence définie par SEQ ID NO 39.

25 16/ Oligopeptide antigénique selon la revendication 15, caractérisé en ce que sa séquence peptidique est identique à une séquence choisie dans le groupe incluant les séquences SEQ ID NO 41 à SEQ ID NO 44.

30 17/ Anticorps mono- ou polyclonal dirigé contre le virus MSRV-1, caractérisé en ce qu'il est obtenu par réaction immunologique d'un organisme humain ou animal, à un agent immunogène constitué par un polypeptide antigénique selon l'une quelconque des revendications 13 à 16.

35 18/ Réactif de détection du virus MSRV-1, ou d'une exposition audit virus, caractérisé en ce qu'il

comprend, à titre de substance réactive, un peptide, notamment antigénique, selon l'une quelconque des revendications 13 à 16, ou un anti-ligand, notamment anticorps dudit peptide.

5 **19/ Composition diagnostique, prophylactique, ou thérapeutique, comprenant un peptide, notamment antigénique, selon l'une quelconque des revendications 13 à 16, ou un anti-ligand, notamment anticorps dudit peptide, selon la revendication 16.**

10 **20/ Composition immunothérapeutique active, notamment composition vaccinale, selon la revendication 19.**

15 **21/ Composition diagnostique, prophylactique, ou thérapeutique, notamment pour inhiber l'expression d'au moins un agent pathogène et/ou infectant associé à la sclérose en plaques, comprenant un fragment nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 4 à 8, ou un polynucléotide, notamment oligonucléotide, dont la séquence est partiellement identique à celle dudit fragment, sauf à celle du fragment ayant la séquence nucléotidique SEQ ID NO 1.**

25 **22/ Procédé pour détecter un agent pathologique et/ou infectant associé à la sclérose en plaques, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce que l'on met en contact un ARN et/ou un ADN présumé appartenir ou provenant dudit agent pathologique et/ou infectant, ou leur ARN et/ou ADN complémentaire, avec une composition comprenant un fragment nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 4 à 8, ou un polynucléotide notamment oligonucléotide dont la séquence est partiellement identique à celle dudit fragment, sauf à celle du fragment ayant la séquence nucléotidique SEQ ID NO 1.**

35 **23/ Procédé pour détecter la présence ou l'exposition à un agent pathologique et/ou infectant associé à la sclérose en plaques, dans un échantillon**

biologique, caractérisé en ce que l'on met en contact ledit échantillon avec un peptide, notamment antigénique, selon l'une quelconque des revendications 13 à 16, ou un anti-ligand, notamment anticorps, dudit peptide, selon la 5 revendication 18.

24/ Dispositif de détection du virus MSRV-1, comprenant un réactif selon la revendication 18, supporté par un support solide, immunologiquement compatible avec ledit réactif, caractérisé en ce qu'il comprend un moyen 10 de mise en contact d'un échantillon biologique, tel qu'un échantillon de sang ou de liquide céphalo-rachidien, susceptible de contenir des anticorps anti-MSRV-1, avec ledit réactif, dans des conditions permettant une éventuelle réaction immunologique, et des moyens de 15 détection du complexe immun formé avec ledit réactif.

25/ Procédé de détection d'anticorps anti-MSRV-1, dans un échantillon biologique, tel qu'un échantillon de sang ou de liquide céphalo-rachidien, caractérisé en ce qu'on met en contact ledit échantillon et un réactif selon 20 la revendication 18, consistant en un anticorps, dans des conditions permettant une éventuelle réaction immunologique, et on détecte ensuite la présence d'un complexe immun formé avec ledit réactif.

-1/35

FIG. 1

Consensus GTTTCAGGGAT ANOCCTCATC TCTTIGGICA GGTACTGGGC CAAGATCTAG 50
 Consensus GCCACTTCTC AGGTOCAGSN ACTCTGTYCC TTCAAG 85

SEQ ID NO 3 (POL MSRV-1B)

Consensus GTTCAGGGAT AGOOOCATC TATTGGOCA GGCACIAGCT CAATACTTGA 50
 Consensus GOCAGTTCTC ATACCTGGAC ATCTGTYCC TTGGGT 85

SEQ ID NO 4 (POL MSRV-1B)

Consensus GTTCARRGGAT AGOOOCATC TATTGGOOW RGYATTAOC CAAGACTTGA 50
 Consensus GYCAATTCTC ATACCTGGAC ACICTGTYCC TTYYRG 85

SEQ ID NO 5 (POL MSRV-1B)

Consensus GTTCAGGGAT AGCTOOCATC TATTGGOCT GGCATTAACC CGAGACTTAA 50
 Consensus GOCAGTTCTC ATACCTGGAC ACICTGTYCC TTIGGG 85

SEQ ID NO 6 (POL MSRV-1B)

Consensus GTGTRGOCAC AGGGGTTAR RGATANCYCY CATCIMTTG GYOWRGYAYT
 Consensus RRCYCRAKAY YIRRGYCAVT TCTYAKRYSY RGSNAYTCTB KYOCTTYRGT
 Consensus ACATGGATGA C

SEQ ID NO 7 (POL MSRV-1B)

2/35

FIG. 2

CONSENSUS A

SEQ ID NO 3

GTTAGGGATAGCCC TCATCTCTTGGTCA GGTACTGGCCCAAGA TCTAGGCCACTTC 60
 V . G . P S S L W S G T G P R S R P L L
 F R D S P H L F G Q V L A Q D L G H F S
 L G I A L I S L V R Y W P K I . A T S Q

AGGTCCAGGCACCTCT GTCCCTTCAG 85
 R S R H S V P . S
 G P G T L F L Q
 V Q A L C S F

CONSENSUS B

SEQ ID NO 4

GTCAGGGATAGCCC CCATCTATTGGCCA GGCACTAGCTAATA CTTGAGCCAGTTCTC 60
 V Q G . P P S I W P G T S S I L E P V L
 F R D S P H L F G Q A L A Q Y L S Q F S
 S G I A P I Y L A R H . L N T . A S S H

ATACCTGGACACTCT TGCCCTCGGT 86
 I P G H S C P S
 Y L D T L V L R
 T W T L L S F G

CONSENSUS C

SEQ ID NO 5

GTCAGGGATAGCCC CCATCTATTGGCCA GGCATTAGCCCAAGA CTTGAGTCATACTC 60
 V Q G . P P S I W P G I S P R L E S I L
 F R D S P H L F G Q A L A Q D L S Q F S
 S G I A P I Y L A R H . P K T . V N S H

ATACCTGGACACTCT TGCCCTTCAG 85
 I P G H S C P S
 Y L D T L V L Q
 T W T L L S F

CONSENSUS D

SEQ ID NO 6

GTCAGGGATAGCTC CCATCTATTGGCT GGCATTAACCCGAGA CTTAAGCCAGTTCTC 60
 V Q G . L P S I W P G I N P R L K P V L
 F R D S S H L F G L A L T R D L S Q F S
 S G I A P I Y L A W H . P E T . A S S H

ATACGTGGACACTCT TGCCCTTG 85
 I R G H S C P L
 Y V D T L V L W
 T W T L L S F

3/35

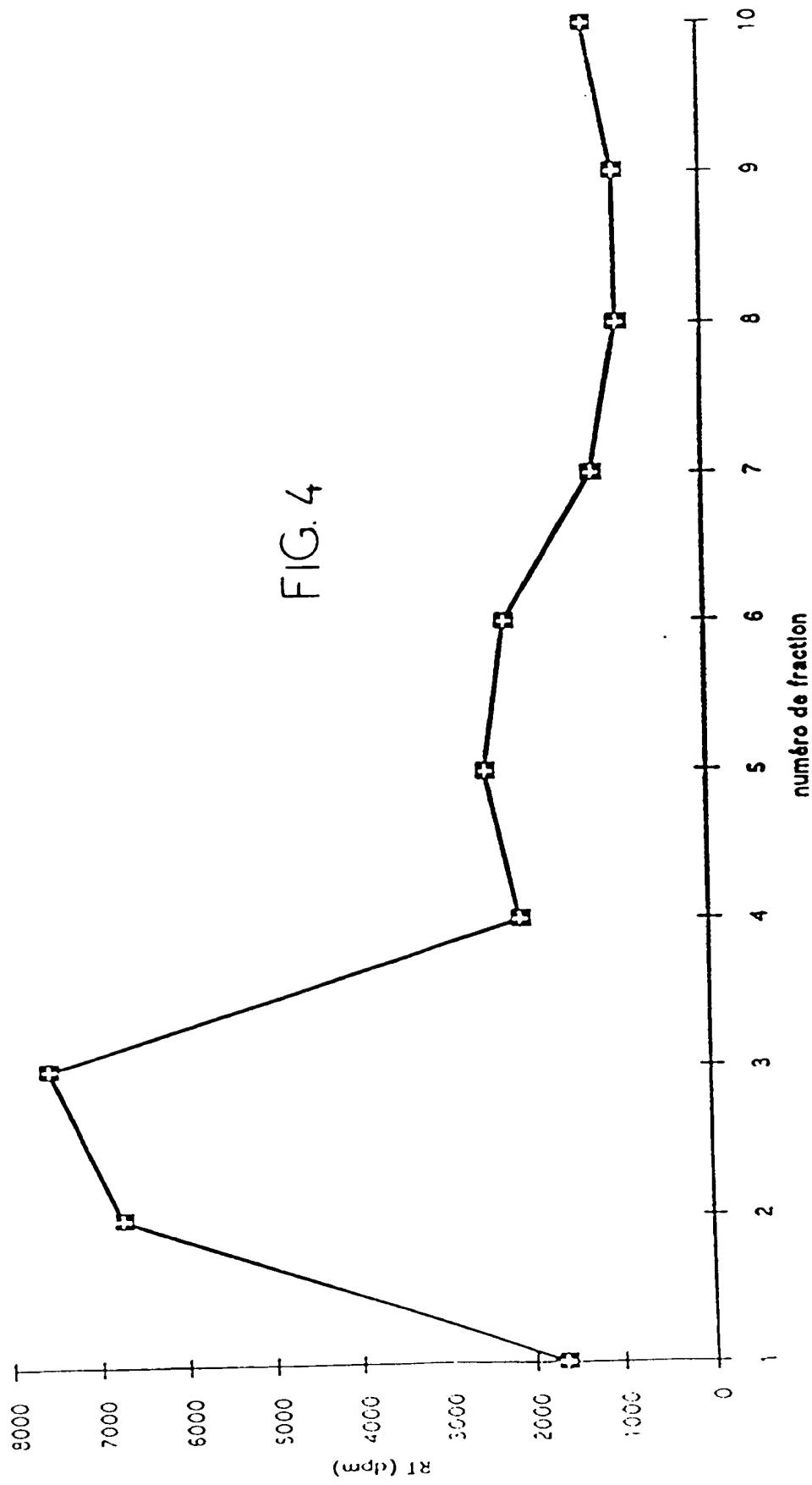
FIG. 3

Consensus	TIGGATOCAG TGYTGCCACA GGGCGCTGAA GCGTATOGCG TGCAGTTGCC	53
Consensus	GGATGCGGCGC TATAGCCCTCT ACGTGGATGA CCTSCCTGAAG CTTGAG	96

SEQ ID NO 11

2737500

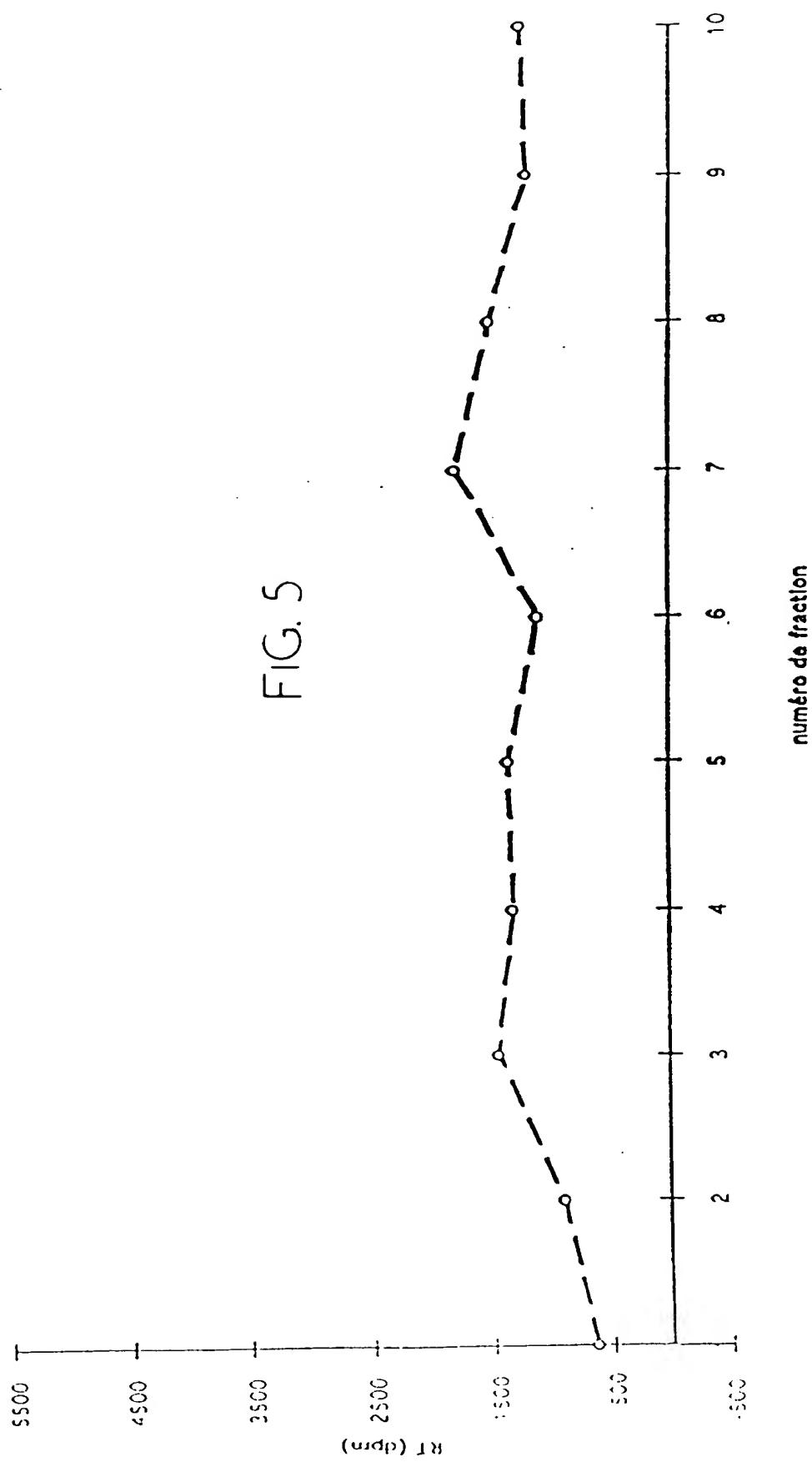
4/35



2737500

S/35

FIG. 5



6/35

FIG. 6

CAAGCCACCC AAGAACCTT AAATTTCCTC ACTACCTGTG GCTACAAGGT	50
TTCCTAAACCA AAGGGCTCAC C TCTGCTCAC A GGAGATTTAGA TACTTTAGGGT	100
TAAAATTATC CAAAGGCACC AGGGGCCTCA GTGAGGAACG TATCCAGCCT	150
ATACTGGGTT ATCCTCATCC CAAAACCTA AAGCAACTAA GAGGGTTCC	200
TAGCATGATC AGGTTTCTGC CGAAAACAAG ATTCGCCAGGT ACAACCAAAA	250
TAGCCAGACC ATTATATACA CTAATTAAAGG AAACCTCAGAA AGCCAATACC	300
TATTTAGTAA GATGGACACC TAAACAGAAG GCTTTCCAGG CCCTAAAGAA	350
GGCCCTAACCC CAAGCCCCAG TGTTCAGCTT GCCAACAGGG CAAGATTTTT	400
CTTATATGG CACAGAAAAA ACAGGAATCG CTCTAGGAGT CCTTACACAG	450
GTCGGAGGGA TGAGCTTGCA ACCCGTGGCA TACCTGAATA AGGAAATTGA	500
TGTAGTGGCA AAGGGTTGGC CTCACTNGTT ATGGGTAAATG GNGGCAGTAG	550
CAGCTINAGT ATCTGAAGCA GTAAAATAA TACAGGGAAAG AGATCTINCT	600
GTGTGGACAT CTCATGATGT GAAOGGCATA CTCACTGCTA AACGGAGACTT	650
GTGGTTGTCA GACAACCATT TACTTAANTA TCAGGCTCTA TTACTTGAAG	700
AGCCAGTGCT GNGACTGCGC ACTTGTGCAA CTCTTAAACC C	741

SEQ ID N09 (PSJ 17)

7/35

TCAGGGATAGCCCCCATCTATTTGCCAGGCATTAGCCCAAGACTTGAGTC
AATTCTCATACCTGGACACTCTTGTCTTCAGTACATGGATGATTACTTT
TAGTCGCCC GTTCAGAAACCTTGTGCCATCAAGCCACCCAAGAACTCTTAA
CTTTCTCACTACCTGTGGCTACAAGGTTCCAAACCAAAGGCTCGGCTCT
GCTCACAGGAGATTAGATACTNAGGGCTAAAATTATCCAAAGGCACCAGG
GCCCTCAGTGAGGAACGTATCCAGCCTATACTGGCTTATCCTCATCCAAA
ACCCCTAAAGCAACTAACAGAGGGTTCCTGGCATAACAGGTTCTGCCGAAA
ACAGATTCCCAGGTACASCCAATAGCCAGACCATTATACACTAATTA
NGGAAACTCAGAAAGCCAATACCTATTTAGTAAGATGGACACCTACAGAA
GTGGCTTCCAGGCCCTAAAGAAGGCCCTAACCCAAGCCCCAGTGTTCA
TTGCCAACAGGGCAAGATTTCTTATATGCCACAGAAAAAACAGGAAT
AGCTCTAGGAGTCCTTACGCAGGTCTCAGGGATGAGCTTGCAACCCGTGGT
ATACCTGAGTAAGGAAATTGATGTAGTGGCAAAGGGTT

SEQ ID NO 8 (MOO3-POO4)

FIG. 7

8/35

290

* **AAG** CGA

८५

9/35

TRANSLATION OF MSRV-1 POL • (A) →

10 20 30 40 50 60 70
 CCC TTT GCC ACT ACA TCA ATT TTA GGA GTC AAC AAA CCC AAC GGA CAG TGG AGG TTA GTG CAA GAA CTC AGG
 P F A T T S I L G V R K P N G Q W R L V Q E L R
 TRANSLATION OF MSRV-1 POL • (A) →

80 90 100 110 120 130 140
 ATT ATC AAT GCG OCT GTT GTT CCT CTA TAC CCA CCT GTC AAC CCT TAT ACA GTG CTT TCC CAA ATA CCA
 I X H E A V V P L Y P A V P H P Y T V L S Q I P
 TRANSLATION OF MSRV-1 POL • (A) →

150 160 170 A 180 190 200 210
 GAG GAA GCA CAG TGG TTT ACA GTC CTG GAC CCT AAG GAT GGC TTT TTC TCC ATC CCT GTC CGT CCT GAC TCT
 E E A E W F T V L D L K D A F F C I P V R P D S
 TRANSLATION OF MSRV-1 POL • (A) →

220 230 240 250 260 270 280
 CAA TTC TTG TTT GCC TTT GAA GAT OCT TTG AAC CCA ACC TCT CAA ACC TGG ACT GTT TTA CCC CAA CGG
 Q F L T A - F E D P L H P T S Q L T W T V L P Q
 TRANSLATION OF MSRV-1 POL • (A) →

290 300 310 320 330 ← B 340 350 360
 TTC AGG CAT AGC CGC CAT CTA TTT GCC CAG GCA TTA GGC CAA GAC TTG AGT CAA TTC TCA TAC CTG GAC ACT
 F R D S P H L F G Q A L A Q D L S Q F S Y L D P
 TRANSLATION OF MSRV-1 POL • (A) →

370 380 390 400 410 420 430
 CTT GTC CTT CAG TAC ATG CAT GAT TTA CTT TTA GTC GGC CGT TCA GAA ACC TTG TGC CAT CAA GGC ACC CAA
 L V L O Y H D D L L L V A R S E T L C H Q A T Q
 TRANSLATION OF MSRV-1 POL • (A) →

440 450 460 470 480 490 500
 GAA CTC TTA ACT TTC ACT ACC TGT GGC TAC AAG GTT TCC AAA CCA AAG GCT CGG CTC TGC TCA CGC CGG
 E L L T F L T T C G Y K V S K P K A R L C S Q P
 TRANSLATION OF MSRV-1 POL • (A) →

510 520 530 540 550 560 570
 ATT AGA TAC TTA CGG CCA AAA TTA TCC AAA GGC ACC AGG GGC TCT AGT GAG GAA CGT ATC CGC CCT ATA CTC
 I R Y X G L K L S K G T R A L S E E R I Q P I
 TRANSLATION OF MSRV-1 POL • (A) →

580 590 600 610 620 630 640
 OCT TAT CCT CGT CCC AAA ACC CCA AAG CCA CCA AGA GGG TTC CTT GGC ATA ACA CGT TTC TCC CGA AAA CGG
 A T P H P K T L E Q L R G F L G I T G F C R K Q
 TRANSLATION OF MSRV-1 POL • (A) →

650 660 670 680 690 700 710 720
 ATT CCC AGG TAC ASC CCA ATA CGC AGA CCA TTA TAT ACA CCA ATT ATG CAA ACT CGG AAA CGC ATT ACC TAT
 I P R Y X P I A R F L Y T L I X E T Q X A N T Y
 TRANSLATION OF MSRV-1 POL • (A) →

730 740 750 760 770 780 790
 TTA GCA AGA TGG AGC CGT ACA CAA GTG GCT TTC CAG GGC CCA AAG AGG CGC CCA ACC CAA CGC CGT TCC
 L V R W T P T E V A F Q A L E K A L T Q A P V P
 TRANSLATION OF MSRV-1 POL • (A) →

800 810 820 830 840 850 860
 AGC TTG CCA AGA CGG CAA GAT TTT TCT TTA TAT GCC ACA GAA AAA ACA GGA ATA GCT CTA GCA GTC CTT ACC
 S L P T G Q D F S L Y A T E K T G Y A L G V L P
 TRANSLATION OF MSRV-1 POL • (A) →

870 880 890 900 910 920 930
 CAG GTC TCA CGG ATG AGC TTG CMA CGC GTG GTC TAC CGT AGT ATG GAA ATT GAT GTC GTG GCA AAG CGT TGG
 Q V S G H S L Q P V V Y L S K E I D V V A K G W
 TRANSLATION OF MSRV-1 POL • (A) →

940 950 960 970 980 990 1000
 CCT CAT NOT TTA TGG GTC ATG GNG GCA GTC TAA GTC TCT GAA CGA GTT AAA ATA ATA CAG GGA AGA
 P H X L W V M X A V A V X V S E A V K I I Q G R
 TRANSLATION OF MSRV-1 POL • (A) →

1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 GAT CTT CCT GCG TGG AGC TCT CAT GAT GTG AAC GGC ATA CTC ACT GCT AAA CGA GAC TTG TGG TTC TCA GAC
 D L X V W T S H D V N G I L T A K G D L W L S D P
 TRANSLATION OF MSRV-1 POL • (A) →

1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150
 AAC CAT TTA CTT AAN TAT CAG GCT CTA TTA CTT GAA GAG CCA GTG CTG NGA CTG CGC ACT TGT GCA ACT CTT
 N H L L X Y Q A L L E E P V L X L R T C A T L
 TRANSLATION OF MSRV-1 POL • (A) →

AAA CCC
 K P →

FIG. 9

SEQ ID NO 1 (MSRV-1 pol*)

2737500

10/35

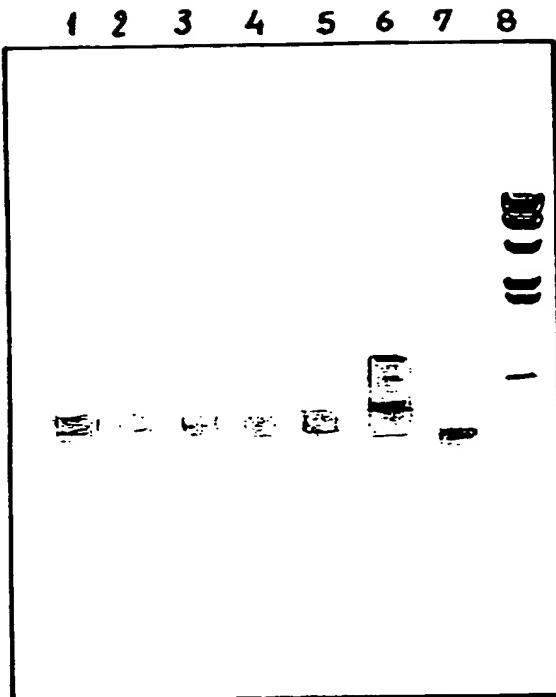


FIG. 10

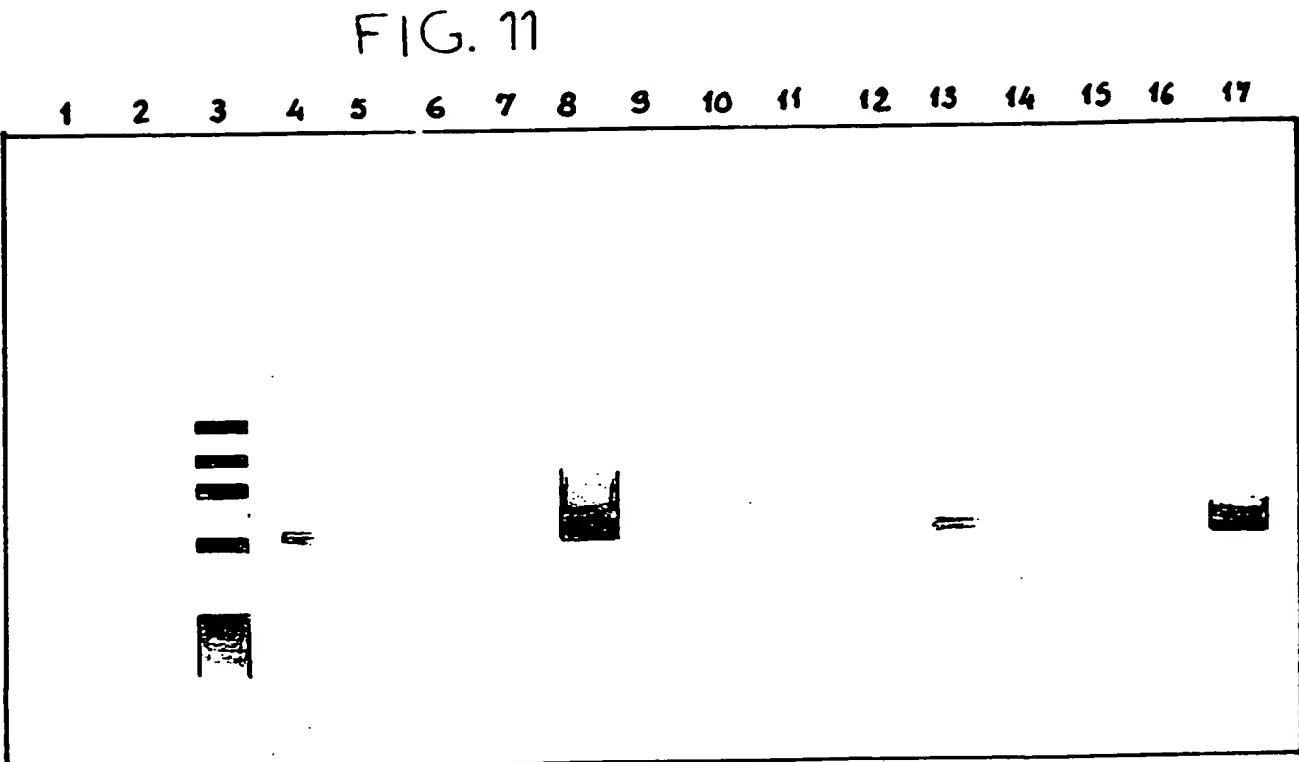
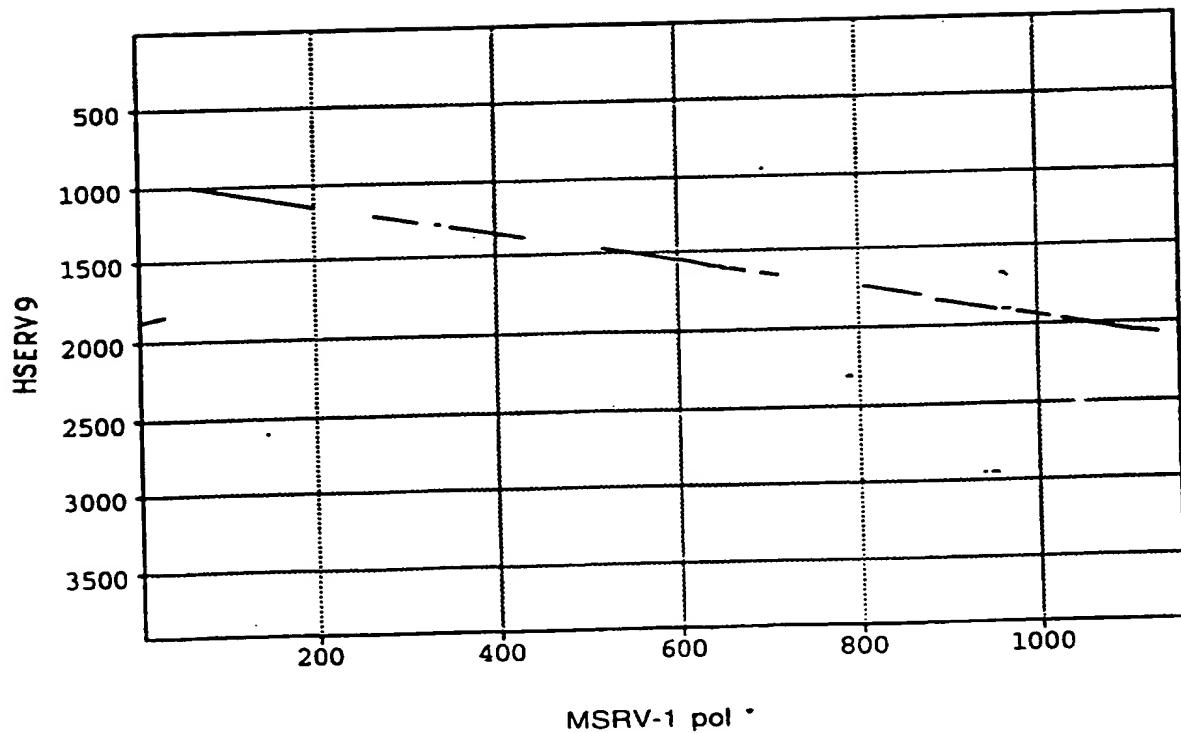


FIG. 11

2737500

11/35

FIG. 12



1935

FIG. 13

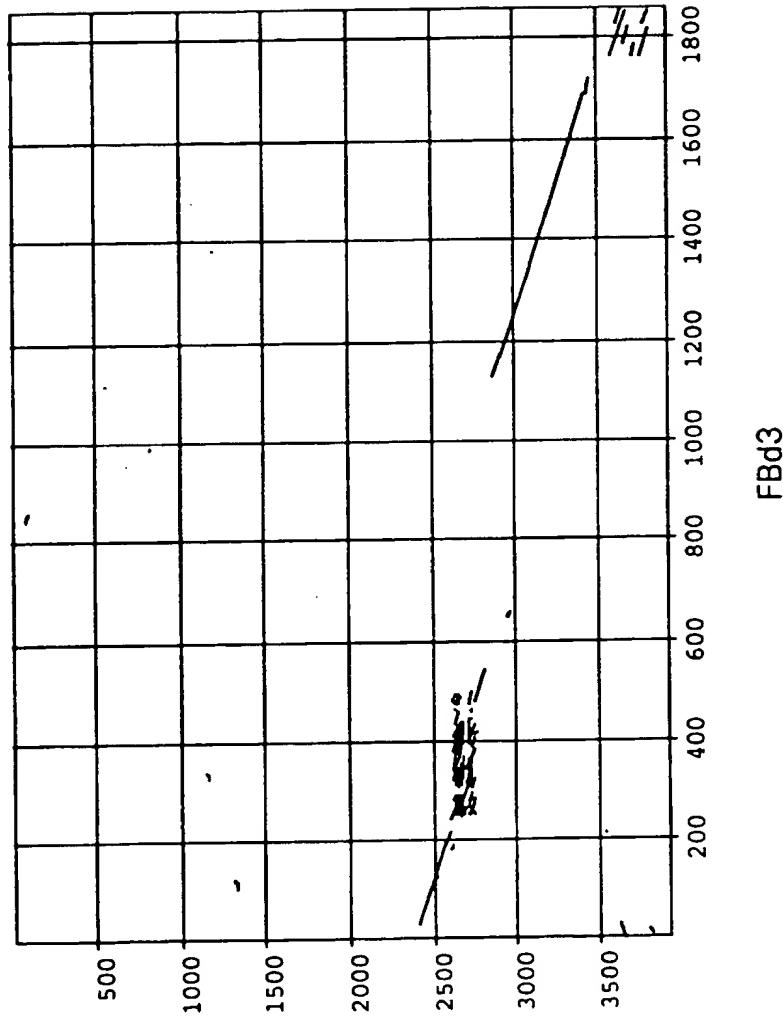
SEQ ID NO 46 (FBd3)

GTGCTGATTGGTGTATTAACAATCCTTATCTAATCCGAAATGCCCATGTTG
CAATATGGAAAGAAAGGGAGTTCTAACCTCTGGGGGAACCCCCATTAAA
TACCACAAGTAAATCATGGAGTTATTGCACACAGTGCAAAAACACTCAAGGA
GGTGGAAAGTCTTACACTGCCAAAGCCATCAGAAAAGGGAAAGAGGGGAGAA
GAGCAGCATAAGTGGCTACAGAGGCAAGGAAAGACTAGCAGAAAGGAAA
GAGAGAAAGAGACAGAAAGTCAGAGAGAGAGAGAGGAAGAGACAGAGCA
CAAAGAGGGAGTCAGAGAGAGAGAGACAGAGAGTCAGAGAGAAGGAA
AGAGAGAGAGGAAGAGACAAAGAATGAATCAAACAGAGAGACAGAAAGT
CAGAGAGAGAGAGAGAGGAAGAGACAGAGAAAAAGAGGGAGTCAGAA
AAAGAGAGACCAAAGAAGAAGAAGTCCAAAGAGAGAAAGAAAGAGAGATGGAAG
TAGTAAAGGAAAAACAGTGTACCCATTCTTAAAAGCCGGGTAAATT
AAAACCTATAATTGATAACTGAAGGTCTCTGTAAACCTGTAAACACTCC
AATACCACCTTGTGTCAAGTGTAAACAAGGGCGTAGCCAAAAGCACTG
AGGCCACTAACAAACCCATAGCCTCCTACAAATTCTTAACCCAGCAGG
TTCTAACAGGGATCTAAATCTAATTAAATTACCATACAATGGTCCAAC
CAGACTTAGGAGGAATTCCCTTCAGGACGGGAAGATAGATGCTCCTCCA
GGCGATTAAGGGAGAAAGACACAATGGGTATTAGTAAGTGCCTAAGGGGA
ACACTTGTAGAAGCAAAGTTAGGAAAATTGCAAATAATTGGTTGCTCAA
GAGTTGTTGCACTCAGCCAAACCTTGAAGTACTTGCAGAATCAGAAAGGA
GCCATCTATACCAATTCTAAGTTAATATGGACTGAAGGAGGTTTATTAAAT
ACCAAAGAGAAATTAAATCCCAAACCTTATAAGGTTTCAACCAAAGTAA
AGTTGCTAAAGTTAACAGCGTAACATGTATTATCCTACTACCACACACT
CTCAAAGGATTCTCAGACAGTTGCAAGAAATAATGATATCTATCCTTAC
TCTACAATCCCAAATAGACTCTTGGCAGCAGTGAUTCTCCAAAACCGTCA
AGGCCTAGACCTCCTCACTGCTGAGAAAGGGAGGACTCTGCACCTTCTTAAG
GGAAGAGTGTGTCTTACACTAACCAAGTCAGGGATAGTATGAGATGCTGC
CCGGCATTACAGAAAAAGGCTCTGAAATCAGACAACGCCTTCAAATT
CTATACCAACCTCTGGAGTTGGCAACATGGTTCTCCCTTCTATGTCCC
ATGGCTGCCATCTGCTATTACTCGCCTTGGCCCTGTATTTAACCTCC
TTGTCAAATTGTTCTTAGGATCGAGGCCATCAAGCTACAGATGGTCTT
ACAAATGGAACCCCAAATGAGCTCAACTATCAACTTCTACTGAGGACCCCT
AGACCAACCCCTGGCCCTTCACTGGCCTAAAGAGTTCCCGTCTGGAGGA
CACTACCACTGCAGGGCCCCATCTTGGCCCTATCCAGAAGGAAGTAGCTA
GAGCAGTCATTGCCAATTCCAAGAGCAGCTGGACTCTGGTGGGTGGGACTTG
GGGGATTGAGAGGTGAAGCCAGCTGGACTCTGGTGGGTGGGACTTG
GAGAACTTTGTGTAGCTAAAGGATTGTAATGCAACAATCAGTGCTCT
GTGTCTAGCTAAAGGATTGTAATACACCAATCAGCAC

2737500

13/35

FIG. 14



FBd3

HSERY9

34/35

FIG. 15

SEQ ID NO 51 (t pol)

GGCTGCTAAAGGAGACTTGTGGTTGTCAGACAATCGCCTACTTAGGTACCA
GGCCTTATTACTTGAGGGACTGGTGCTTCAGATGCGCACTTGTGCAGCTCT
TAACCCAAACTTATGCTGCCAGAAGGATCTTTAGAGGTCCCCCTAGCCA
ACCCTGACCTCAACCTATATATATACTGATGGAAGTTCGTTGTAGAAAAG
GGATTACAAAGGGNAGGATATNCCATAGGTTAGTGATAAAAGCAGTACTTG
AAAGTAAGCCTCTTCCCCCCCAGGGACCAGCGCCCCCGTTAGCAGAACTAGT
GGCACTGACCCCGAGCCTAGAACCTGGAAAGGGAGGAGGATAAAATGTGT
ATACAGATAGCAAGTATGCTTATCTAATCCGAAATGCCATGTTG

45|35

SEQ ID NO 52 (JLBc1)

TCAGGGATAGCCCCCATCTATTGGTCAGGCACTGGCCAAGATCTAGGGA
 CATGCCACTTTAACAGGCCATTCTCAAGTCCAGGTACTCTGGCCTTCGGT
 ATGTGGATGATTACTTTGGCTACCAGTCACTAGCCTCATGCCAGCAGG
 CTACTCTAGATCTCTGAACCTCTAGCTAATCAAGGGTACAAGGCATCTA
 GGGTAAGGCCAGCTTGCCACAGCAGGTCAAATATCTAGGCCTAATCT
 TAGCCAGAGGGACCAGGGCACTCAGCAAGGAACAAATACAGCCTATACTG
 GCTTATCCTCACCTAACAGACATTAAAACAGTTGCGGGGGTTCCTTGAATC
 ACTGGCTTTGGTACTATGGATTCCCAGATAAGCAAGATTGGCAGGCC
 CCTCTATACTGTAATCAAGGAGACTCACGAGGGCAAGTACTCATCTAGTAG
 AATGGGAACTAGGGACAGAAACAGCCTCAAAACCTTAAGCAGGCCCTA
 GTACAATCTCCAGCTTAAGCCTCCCACAGGACAAAACCTCTTATAC
 ATCACAGAGAGGGCAGAGATAGCTTGGTGTCCATTTCAGACTCATGGG
 ACTACCCCACAACCAAGTGGCACACCTAACGTAAGGAATTGATGTAGTAGC
 AAAAGGCTGGCCTCACTGTTATGGGTAGCTGTGGTGGCTGTCTTAGT
 GTCAGAACGCTATCAAATAATACAAGGAAGGATCTCACTGTCTGGACTA
 CTCATGATGTAATGGCATACTAGGTGCCAAAAGAAGTTATGGGTATCAGA
 CAACCCACCTGCTTAGATACCAGGGACTACTCCTGGAGGATTGGCTCAAG
 TGCCTTTTGTCGGCTCAACCCCTGCCACTTTCCCTCAGAGGATGGAGAG
 CCGCTTGAGCATGCTGCCAACAGTTGAGGCCAGATTATTCCACCCGA
 GATGATCTCTTAGAGTACCCCTAGCTAACCTGACCTAACCTATATACCA
 ATGGAAGTTCAATTGGAAAACGGGATATGAAGGGCAGGTTATGTCATAG
 TTAGTGATGTAATCATACTTCAAGTAAGCCTTACCCAGGGGCCAGCA
 CTCAGTTAGCAGAACTAGTCACACTAACCTAACCTAGTAAGTATGCTTATCTAATCCTAC
 ATGCCCATGCTGCAATATGGAAGGAAAGGGAGTTCTAACCCCTGGGGGA
 ACCCCCATTAAATACCACAAGGYAAATCATGGAGTTATTGCACGCAGTGC
 AAAAACTCAAGGAGGTGGCAGTCTACACTGCCGAAGCYATCAAAAAGGG
 GAAGGAGAGGGGAGAACAGCAGCATAAGTGGTGGCAGAGGCAGTGAAA
 GACCAGCAGAGAGAAGGGAGAGAACAGTCACGACAGAAGGAAAGAA
 GAGGAGGAGACAGAGAGGAAGAGAGACAGAGAGACAGTTAGTCCAAGAGAG
 AGACAGAGAGAGGAAGAGACAGACAGAAAGTCCAAGAGAGAAGGAAAGA
 GAGGAAGAGACCAAGGAGTCCNAGAGAGAGAACAGTCACGACAGAAGGAAAGAA
 AGAAAAAACATTGTACCCATTCCCTAAAGCCGGGTATATTAAAACC
 TATAATTGATAATTGAGTTCTGCACCCCTCCAGGGATYGCTGGAGG
 AAACCCCTCAACCGATATGTAAAATTGTGGTCGTCCTATGTCTCAATT
 CCAGCCAATACCCCTTGTTTAGTGTGAACGAGGGTGTAGAGCGCAGAC
 AGGGAGACCTCTGACAATCCATACCCCTCTATCCAAAATCCTAACCCAG
 CAGGTTTCTAAAGGGATCTAAATCTTAATTAAATTACCATACAAAGTC
 AAACCAGATCTAGGAGGAACCTCCCTCAGGACAGGATGATAGATGGTCT
 CCCAGGCATTAAAGAAAATAAAAGACACATGGGCAGCCAGTAAGTGT
 AAGGGAACACTAGTAGAACGAGTTAGGAGAAGTGCCTAATAATTGGTCT
 ACTCCAAATGTGTGAGTTGTCGCACTCAGCCAAATCTTAAAGTACTTAC
 AGAATTAGGGAGGAGCCATTACACCAATTCTAAGTTAATATGGACTGGAT
 GAGGTTTATTAAATAGCGAAGGAGAATTAAATCTAAACTNACAAGGTTT
 CAACTAAAGTAAATTACTAAAGCTAACAGTGTAAACATGCATTATCCTA
 CTACAACACACTCTCANAGGATTCCCTCAGACAGTTACAAGAAATAACAA
 AATCTATCTGGTAAGGATAGTAACTACAATCCAAATACATTCTTGGCAG
 CAGTGAECTC

FIG. 16

16/35

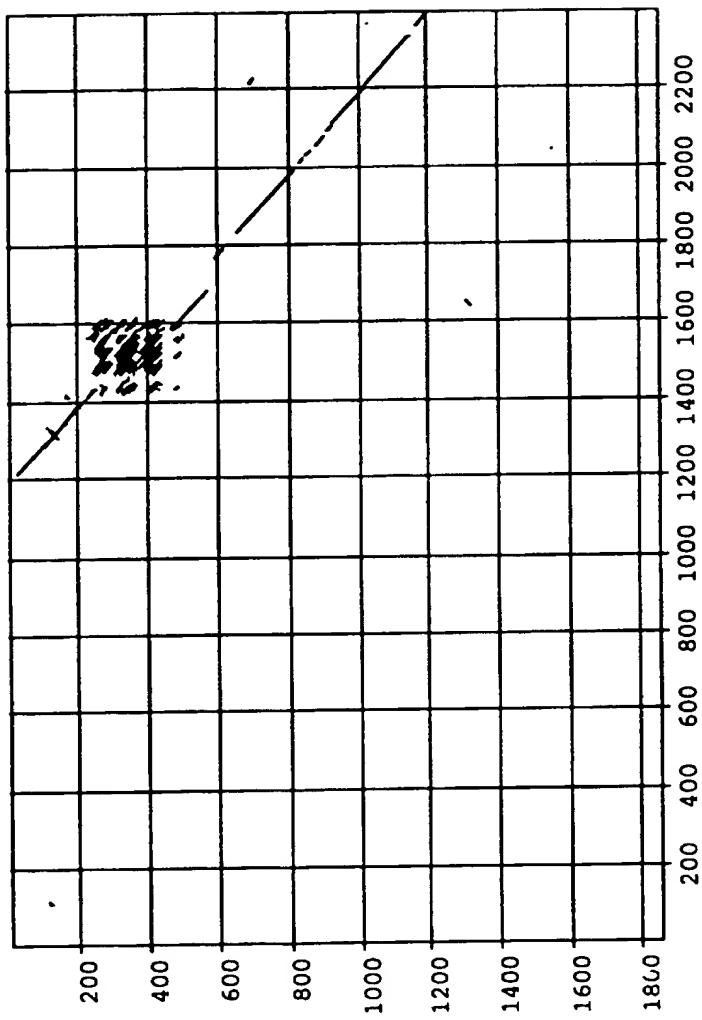
SEQ ID NO 53 (JLBc2)

TCAGGGATAGCCCCATCTATTGATCAGGCACTAGCCCAAGATCTAGGCC
 ACTTCTGAAGTCCAGGCATTCTAGTCCTCAGTATGTGGATGATTACTTT
 GGCTACCACTTGGAACCTCATGCCAGCAGGCTACTTGAGATCTCTGAA
 CTTCTAGCTAATCAAGGGTGTGGCATCTAAATTGAAAGTCCAGCTCG
 CCTACACAACAAGTCAAATATCTAGGCCTAATCTTAGATAGAAGAACCGAGG
 CCCTCAGCAAGGAATGAATAAAGCCTATGCTGGCTTATCGGCACCCCTAAGA
 CATTAAAACAATTGTGGGGGTTCTTGGAAATCACTGGCTTTGCCACTAT
 GGATCCCTGGATAGAGTGAGATAGCCAGGCCCTCTATTACTCTTATCAA
 GGAGACCCAGAGGGCAAATACTTATCTAGTATTATGGGNACCAGAGGCAG
 AAAAAGCCTTCAAACCTAAAGGAGACCTAGTACAAGCTCAGCTTAA
 GCCTTCCCACAGGACAAANCTCTTATATGTCACAGAGAGAGCAGGAA
 TAGCTCCTGGAGTCCTACTCAGACTTTGGACGACCCACGGCCAGTGGC
 RTACCTAAGTAAGGAAATTGATGTAGTAGCAAAAGGCTGGCCTACTGTT
 ATGGGTAGTTGGCGCTGTGGCAGTCTTACTGTCAAAGGCTATCAAATAAT
 ACAAGGAAAGGATTCACTATCTGGACTACTCATGAGGAAATGGCATATT
 AGGTCCAAGGAAGTTTGGCTATCAGACAACCACCTGCTCAGATTCCA
 GGCACACTGATTGAGAGACCACTGCTTAAATATGATGTGTGTGTGG
 CCCTCAACCCTGCCACTGTTCTCCAGAAGATGGAGAACCAATGAAGCATT
 ACTGTCAACAAATTAGAGTCAGAGTTATGCTGCCTGAGAGGATCTCTTAG
 AAGTCCCCTAGCTAATCCTGACCTAACCTATATGCTGATGGAAGTTCAC
 TTGTGGAGAATGGGATACGAAAAGCACATTATGCCATAGTTAGTGAGGTA
 ACAGTACTTGAAGTAAGCCTATTCCCCCATGGACCAGAGCCCAGTTAGCA
 GAACTAGTGGCACTTACCCAAAGCCTAGAAACTAGGAAAGGAAAAATAAT
 AAATGTGTATACAGATAGCAAGTATGCTTATCTAATCCTACATGCCATGC
 TGCACTATGGAAAGAAAGGGAGTTCTAACCTCTGGGGAACCCCCATTA
 AATACCACAAGGCAAATCATGGAGTTATGCACTGAGGAAACCTCAA
 GTAGGTGGCAGTTTACACTGCCTGAAGCTATGGGAAGGAGAGGAGA
 ACAGCAGCATAAGTGGCTAGCAGAGGCAGCGAAAGACTAGCAGAGAGGA
 GAGGTAGGGAAAGACAGAAAGTCAAAGAAAAGAAGTCAAAGACAGACA
 GAGAAAGAGACAGAGGGAGCCAGAGAGAAAGAAAAGAGAACGAAAGA
 GACAGAATGTCAAAGAACAGAACAGAGAGAGGAGCGCCAGAACAGTTAAG
 AAAGTGAGAAAGAGAGATGGAATAGTAAAGAAAAAACAGTGTACCCAT
 TCCTTAAAGCCAGGGTAAATTAAACGTATAATTITATAATTGGAAGG
 TCTTCTCCATAACCCTATAACATTAACACCACCTTGTGTCAGTGTAAAC
 AAGAGCATAGCCAAAAGCACTGAGGCCACTGACAACCCATAGCCTCCT
 ATCAAAAATCCTTAACCTGAGGTTCTAACAGGGGATCTAAATCTCAA
 CTAATCACCATAACATGGTCCGACCAAGACCTAGGAGCGACTCCCTCAGG
 ACAGAAGGATGGATGGTCTCTCCAGGCCATTAGGGAAAGAGACACAAAT
 GGGTATTCAAGTGTAAAGGAAACTCTGTAGAACAGCAGTTAGGAAGATT
 GCCTAACATTTGGTCTGCTCAAATGTGCCAGCTGTTGCACTCAGCTAAC
 CTTAAATTACTACAGAATTAGGAAGGAGCCATCTACCAATTCTGAGTT
 AATATGAGCTGAACAAGTCTTATTAAATAGCAAAGAACATTGAAATCTCA
 AACTTGCAAAGTTCAACAAAAGTAAAGTTGCTGAAAGTTAGCAGTGTAA
 ACATGTATTATCCTAACCTCTAATCTTGGAATCAGACCCCTATCAGTGC
 CCCTCAAAGCTGAAGTCCATCAGCATATGCCATACAACAAACCTAT
 TTATAGGGTTAGGAATGCCACTGCTACAGGAATGGGAGTAACAGGTTTAT
 CTACTTCATTATCCTATTACCAACACACTCTAAAGGATTCTCAGACAGTT
 ACAAGAAATAACAAAATCTATCCTTACTCTNTARTCCCAAATAGRTTCTT
 GGCAGCAGTGAUTCTC

2737500

17/35

FIG. 18



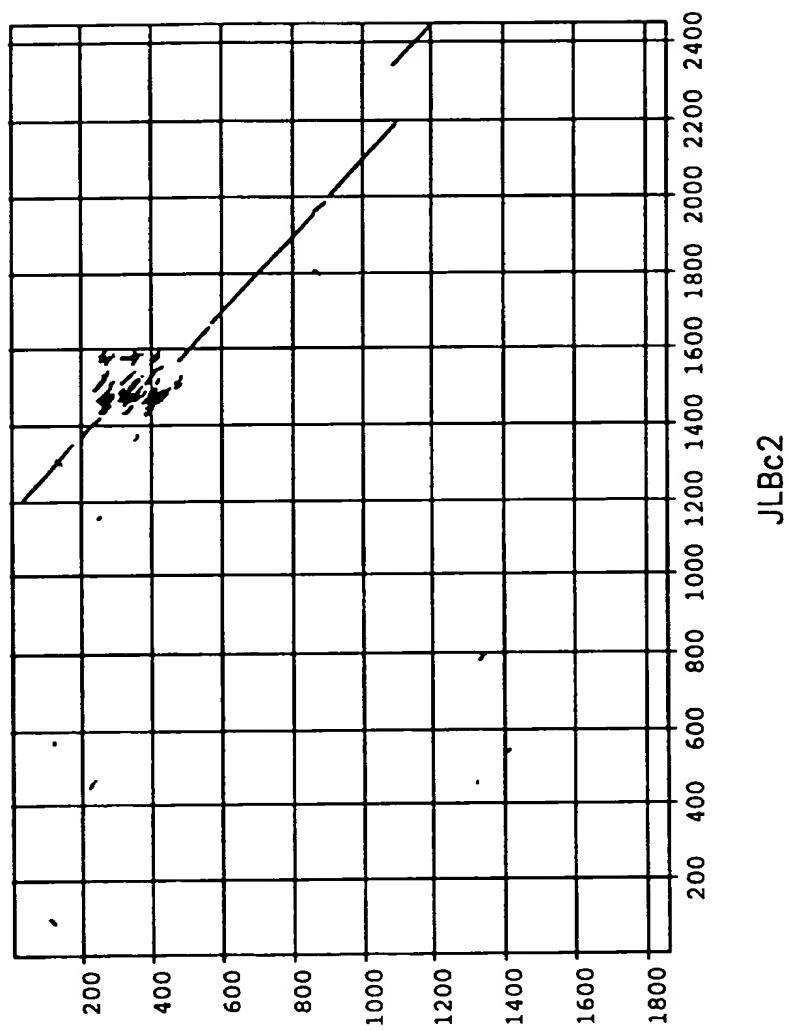
JLBc1

FBd3

2737500

-18/35

FIG. 19



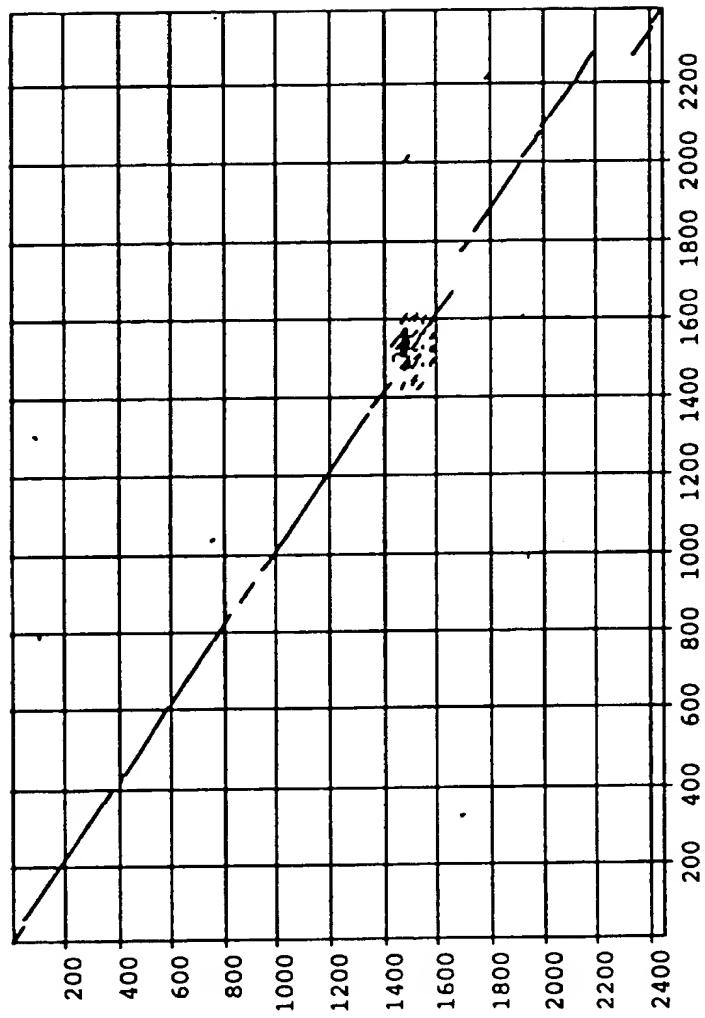
JLBc2

FBd3

2737500

18/35

FIG. 20



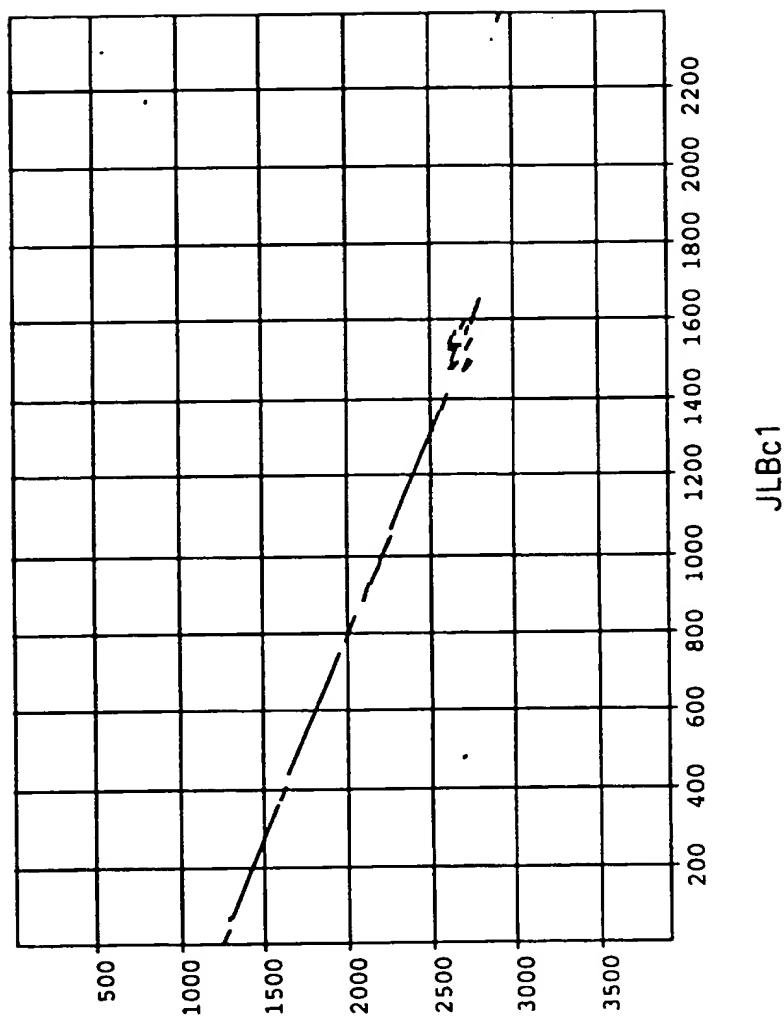
JLBc1

JLBc2

2737500

26/35

FIG. 21

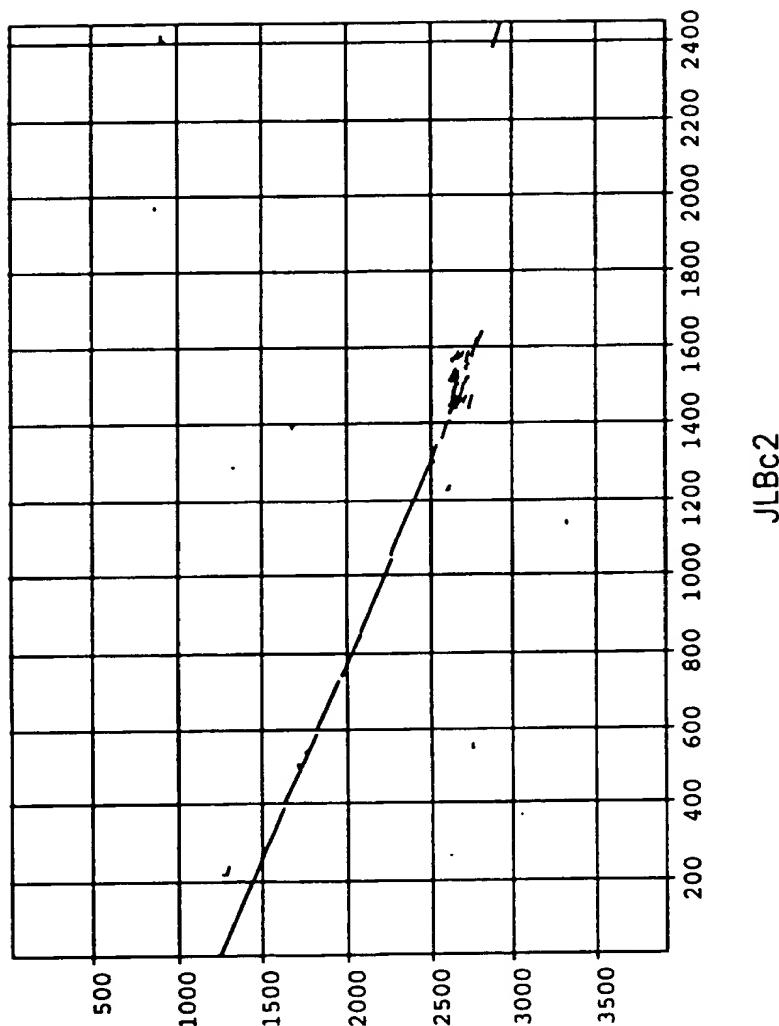


HSERY9

2737500

24/35

FIG. 22



JLBc2

HSERY9

22|35

1 TTCCTGAGTT CTTGCACTAA CCTCAAATGA GAGAAGTGCC GCCATAACTG CAACCCAAGA
61 GTTGGCGAT CCCTGGTATC TCAGTCAGGT CAATGACAGG ATGACAAACAG AGGAAAGATA
121 ATGATTCCCC ACAGGCCAGC AGGCAGTTCC CAGTGTAGAC CCTCATTAGG ACACAGAAC
181 AGAACATGGA GATTGGTGCC GCAGACATTG GCTAACTTGC GTGCTAGAAG GACTAAGGAA
241 AACTAGGAAG ATATGAATTA TTCAATGATG TCCACTATAA CACAGGGGAA AGGAAGAAAA
301 TCCTACTGCC TTTCTGGAGA GACTAAGGGA GGCATTGAGG AAGCATACCA GGCAAGTGG
361 CATTGGAGGC TCTGGAAAAG GGAAAAGTTG GGAAAAGTAT ATGTCTAATA GGGCTTGCTT
421 CCAGTGTGGT CTACAAGGAC ACTTTAAAAA AGATTGTCCA ATAGAAATAA GCCACCACCT
481 CGTCCATGCC CCTTATGTCA AGGGAATCAC TGGAAGGCC ACTGCCAGGG GGGATGAAGG
541 TCCTCTGAGT CAGAAGCCAC TAACCAGATG ATCCAGCAGC AGGACTGAGG GTGCCCGGG
601 CAAGGCCAG CCCATGCCAT CACCCCTCACA GAGCCCCAGG TATGCTTGAC CATTGAGGGT
661 CAGAAGGGTA CTGTCTCCTG GACACTGGCG GGCCTCTCA GTCTTACTTT CCTGTCCTGG
721 ACAACTGTCC TCCAGATCTG TCACGTCCG AGGGGTCCCA GGACAGCCAG TCACTAGATA
781 CTTCTCCCAG CCACTAAGTT GTGACTGGGG AACCTTACTC TTCCACATGC TTTTCTAATT
841 ATGCCTGAAA GCCCCACTCT CTGTTAGGG GAGAGACATT CTAGAAAAG CAGGGGCCAT
901 TATACATGTG AATATAGGAG AAGGAACAAAC TGTTGTTGT CCCCTGCTTG AGGAAGGAAT
961 TAATCCTGAA GTCCGGCAA CAGAAGGACA ATATGGACAA GCAAAGAATG CCCGTCTGT
1021 TCAAGTTAAA CTAAAGGATT CCACCTCCTT TCCCTACCAA AGGCAGTACC CCCTCAGACC
1081 CGAGACCCAA CAAGAACTCC AAAAGATTGT AAAGGACCTA AAAGCCCAAG GCCTAGTAAA
1141 ACCAAGCAAT AGCCCTTGCA AGACTCCAAT TTTAGGAGTA AGGAAACCCA ACGGAC

SEQ ID NO 56 (GM3)

FIG. 23

2737500

23/35

HSERY9

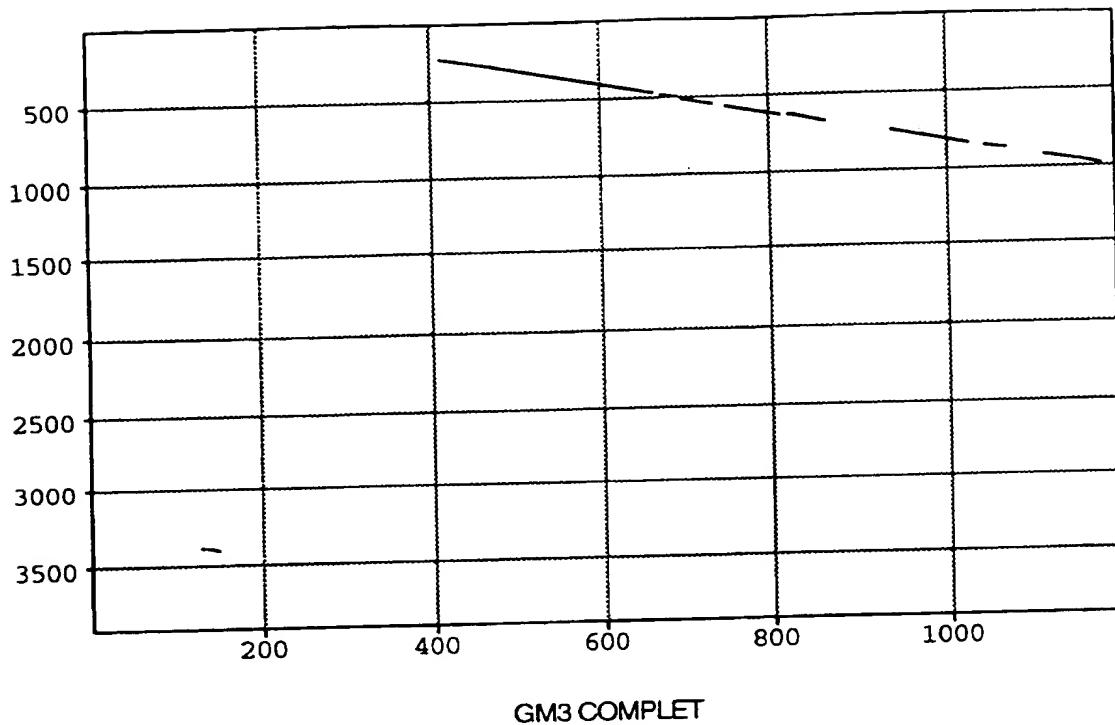
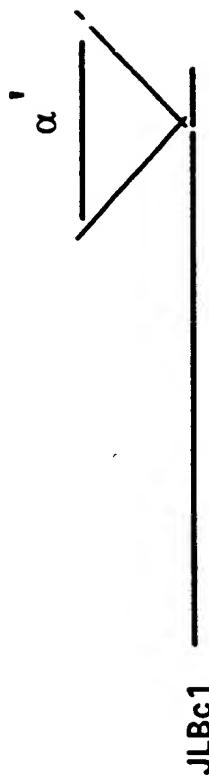


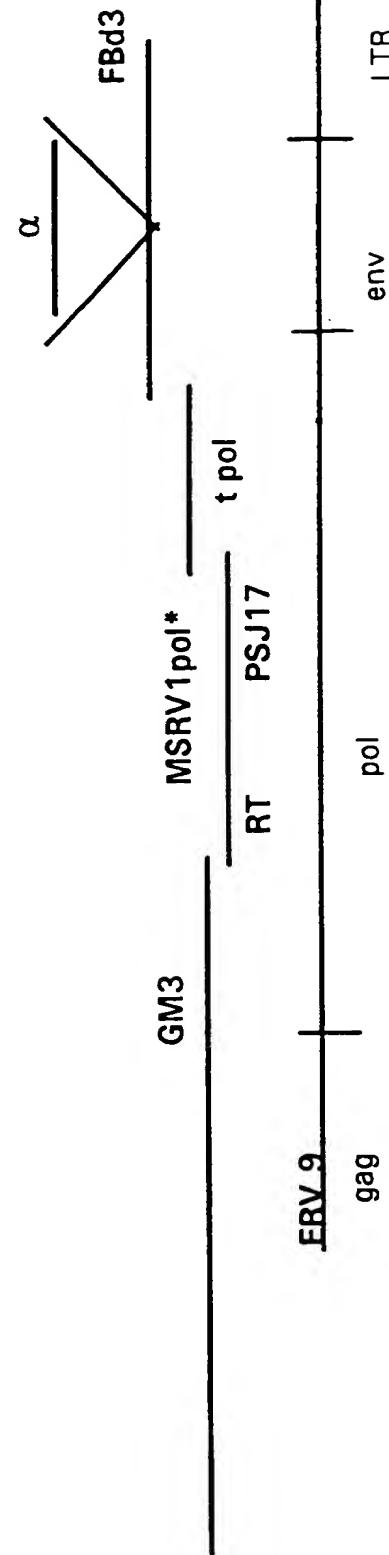
FIG. 24

2737500

FIG. 25



$\frac{24}{35}$



2737500

25|35

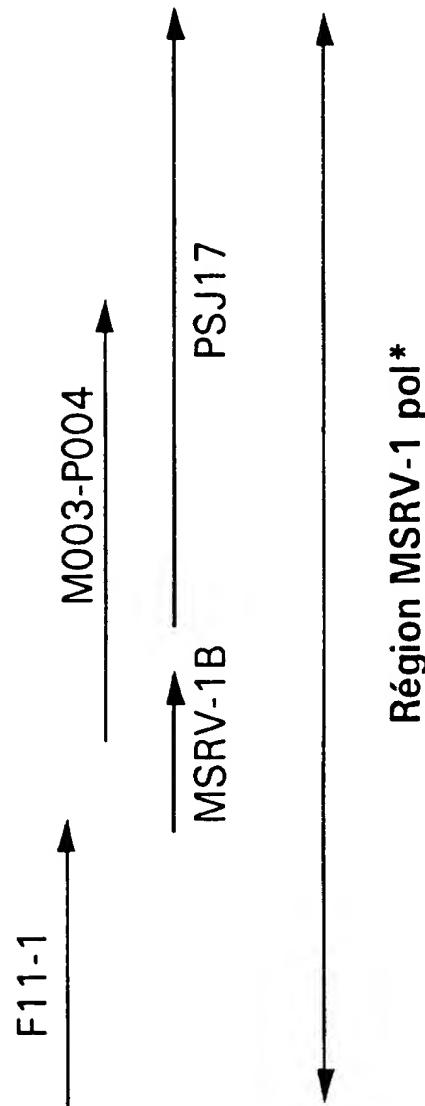


FIG. 26

26/35

FIG. 27a

SEQ ID NO 57 (POL)

ATG ATC CAG CAG CGG GAC NCA GGG TGC CGG CAA GCG CAT GCC ATC ACC CTC ACA GAG CCC CGG GAA TGC TTG ACC ATT GAG
 M I Q Q D X G C P G Q A P A H A I T L T E P Q V C L T I E 90

 CCT CAG AAG AGT NAC TGT CTC CTG GAC ACT GGC ACT GGC TCC GTC TTA CTT TCC TGT CCT GGA CAA CTG TCC AGA TCT GTC ACT
 G Q K G X C L L D T G G A F S V L L S C P G Q L S S R S V T 180

 GTC CGA CGG GTC CTA GGA CAG CCA GTC ACT AGA TAC TTC TCC CAG CCA CTA AGT TGT GAC TGC TGG GAA ACT TTA CTC TTC CCA CAT GCT TTT
 V R G V L G Q P V T R Y F S Q P L S C D W G T L F P H A F 270

 CTA ATT ATG CCT GAA AGC CCC ACT CTC TTG TTG GGG AGA GAC ATT CTA GCA AAA GCA GCA ATT ATA CAT GTG ATT ATA GCA GAA GCA
 L I M P E S P T L L G R D I L A K A G A I G A I H V N I G E G 360

 AGA ACT GTT TGT TGT CCT GTC GAA GGA ATT ATT CCT GAA GTC CGG GCA ACA GAA GAA GAA TAT GGA CAA GCA AAG AAT GCC CGT
 T T V C C P L L E E G I N P E V R A T E G Q Y G Q A K N A R 450

 CCT GTT CAA GTT AAA CTA AAG GAT TCC ACC TCC ATT CCC TAC GAA AGG CAG TAC CCC CTC AGA CCC GAG ACC CAA CAA GCA CTC CAA AAC
 P V Q V K L K D S T S F P Y Q R Q Y P L R P E T Q Q E L Q K 540

 ATT GTC AAG GAC CTA AAA GGC CAA GGC CTA GTC AAA CCA AGC ATT AGC CCT TGC AAG ACT CCA ATT TTA GCA GTC AGG AAA CCC AAC GCA
 I V K D L K A Q G L V K P S N S P C K T P I L G V R K P N G 630

 CAG TTG AGG TTA GTC CAA GAA CTC AGG ATT ATC ATT GAG CCT GTT CCT CTC CCT AAC CCT ATT ACA GTC CCT TCC
 Q W R L V Q E L R I I N E A V V P L Y P A V P N P Y T V L S 720

 CAA ATA CCA GAG GCA GCA CGG TTG ACA GTC CTC AGG ACT GTT TTA CTC CCT GCA GTC ATT CCT GCA GTC CCT GCA TCC
 Q I P E E A E W F T V L D L K D A F F C I P V R P D S Q F L 810

 TTT GCC TTT GAA GAT CCT TTG AAC CCA AGC CTC ACC TGG ACT GTT TTA CCC CAA GGG GAT ACC CCC CAT CTC TTT GGC
 F A F E D P L N P T S Q L T W T V L P Q G F R D S P H L F G 900

 CAG GCA TTA GGC CAA GAC TGC AGT GAA TTC TCA TAC CTC CTG GAC ACT CCT GTC CTC GTC GAC ATT GAT GTC TTA GTC GGC CGT TCA
 Q A L A Q D L S Q F S Y L D T L V L Q Y M D D L L V A R S 990

 GAA ACC TTG TGC CAT CAA GCA ACC GCA GCA CTC TTA ACT TTC CTC ACT ACC TGT GGC TAC CAG GTT TCC AAA CCA AAG GCT CGG CTC TGC
 E T L C H Q A T Q E L T C G Y K V S K P K A R L C 1080

2737500

27/35
FIG. 27b

SEQ ID NO 57 (POL)

TCA CAG GAG ATT AGA TAC TTA GGG CTA AAA GGC ACC AGG GCC CTC AGT GAG GAA CGT ATC CAG CCT ATA CTG CCT ATA CTG CCT 1170
S Q E I R Y X G L K L S K G T R A L S E E R I Q P I L A Y P

CAT CCC AAA ACC CTA AAG CAA CTA AGA GGG TTC CTT GGC ATA ACA GGT TTC TCC CGA AAA CAG ATT CCC AGG TAC ASC CCA ATA GCC AGA 1260
H P K T L K Q L R G F L G I T G F C R K Q I P R Y X P I A R

CCA TTA TAT ACA CTA ATT ANG GAA ACT CAG AAA GCC AAT ACC TAT TTA GTA AGA TCG ACA CCT ACA GAA GTG CCT TTC CAG GCC CTA AAG 1350
P L Y T L I X E T Q K A N T Y L V R W T P T E V A F Q A L K

AAG GCC CTA ACC CAA GCC CCA GTC GTG TTC AGC TTG CCA ACA GGG CAA GAT TTT TCT TTA TAT GCC ACA GAA AAA ACA GGA ATA GCT CTA GCA 1440
K A L T Q A P V F S L P T G Q D F S L Y A T E K T G I A L G

GTC CTT ACG CGG GTC TCA GGG ATG AGC TAC GCA CCC GTG GTC TAC GAA ATT GAT GTA GTG GCA AAG CGT TCG CCT CAT NST 1530
V L T Q V S G M S L Q P V V Y L S K E I D V V A K G W P H X

TTA TGG GTA ATG GAG GCA GTC GCA GTC TTA GTC TCT GAA GCA GTT AAA ATA ATA CGG CGA AGA GAT CTT NST GTG TGG ACA TCT GAT GAT 1620
L W V M X A V A V X V S E A V K I I Q G R D L X V W T S H D

GTG AAC GGC ATA CTC ACT GCT AAA CGA GAC TTG TGG TCA GAC AAC GAT TTA CTT AAN TAT CGG GCT CTA TTA CTT GAA GAG CCA GTG 1710
V N G I L T A K G D L W L S D N H L L X Y Q A L L E E P V

CTG NGA CTG CGC ACT TGT CGA ACT CTT AAA CCC AAA CTT ATG CTG CCC CGA AGG ATC TTT NTA GAG GTC CCC TTA GCC AAC CCT GAC CTC 1800
L X L R T C A T L K P K L M L P R R I F X E V P L A N P D L

AAC TAT ATA TAT ACT GAT CGA AGT TCG TTT GTA GAA AAG GGA TTA CGA CGA TAT NCC ATA CGT GTT AGT GAT AAA CGA GTC CTT 1890
N Y I Y T D G S S F V E K G L Q R X G Y X I G V S D K A V L

GAA AGT AAG CCT CTT CCC CGG CGA CGA CGG CCC CGG TTA CGA CGA CGA CGA CGC TCA GTG CGA CGA CGC ACC CGG CGC TTA GAA CTT TGG AAA CGG 1980
E S K P L P P Q G P A P P L A E L V A L T P R A L E L W K G .

AGG AGG ATA ATG GTG TAT ACA GAT AGC AAG TAT GCT TAT CTA ATC CGA ATG CGC CAT GTT TAT CTA ATC CGA AAT GCC CAT GTT CGA 2070
R R I N V Y T D S K Y A Y L I R N A H V V Y L I R N A H V A

ATA TGG AAA GAA AGG GGG TTC CTA ACC ACC TCT GGG CGA ACC CCC ATT AAA TAC CAC AAG TTA ATG GAG TTA TTG CAC ACA GTG CAA AAA 2160
I W K E R E F L T S G G T P I K Y H K L I M E L L H T V Q K

28/35

SEQ ID NO 57 (POL)

CTC AAG GAG GTG GAA GTC TTA CAC TGC CAA ACC CAT CAG AAA AGG GAA GCA GAG CAG CAT AAG TGG CTA CAG AGG CAA CGA AAC
L K E V E V L H C Q S H Q K R E R G E E Q H K W L Q R Q G K 2250

ACT AGC AGA AAG GAA AGA GAG ACA GAA AGT CAG AGA GAG ACA GAG GAA GAG GCA AAA GAG GCG AGA GTC AGA GAG AGA GAG
T S R K E R E K E T E S Q R E R E T E H K E G V R E R E 2340

AGA CAG AGA GTC AGA GAG AAG GAA AGA GAG AGA GCA AGA GAC AAA GAA TGA
R Q R V R E K E R E R G R D K E . 2391

FIG. 27c

29|35

FIG. 28

GATGCCTTTCTGCATCCCTGTACGTCCCTGACTCTCAATTCTTGCCTTGAAAG
ATCCTTGAAACCAACGTCTCAACTCACCTGGACTGTTTACCCCAAGGGTTCAGGGA
TAGCCCCATCTATTGCCAGGCATTAGCCAAGATGCCTTTGCATCCCTGTACGTG
ACTCTCAATTCTTGCCTTGCCCTTGAAAGATGCTTGAAACCCAAACGTCTCAACT
CACCTGGACTGTTTACGCCAAGGGTCAGGGATAGCCCCATCTATTGGC
CAGGCATTAGCCCAA

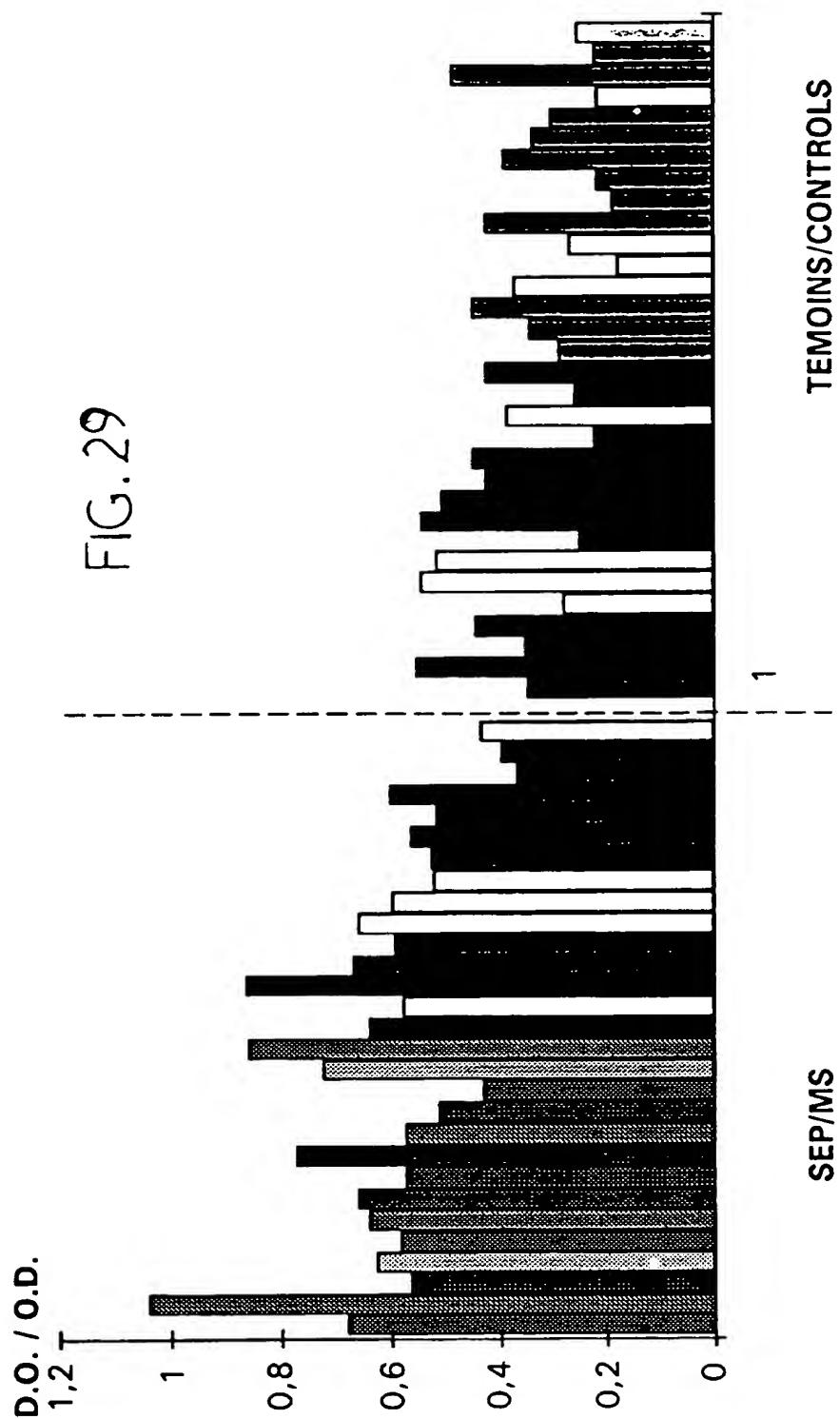
SEQ ID NO 40

Asp-Ala-Phe-Phe-Cys-Ile-Pro-Val-Arg-Pro-Asp-Ser-Gln-Phe-
Leu-Phe-Ala-Phe-Glu-Asp-Pro-Leu-Asn-Pro-Thr-Ser-Gln-Leu-
Thr-Trp-Thr-Val-Leu-Pro-Gln-Gly-Phe-Arg-Asp-Ser-Pro-His-
Leu-Phe-Gly-Gln-Ala-Leu-Ala-Gln

SEQ ID NO 39 (POL2B)

30/35

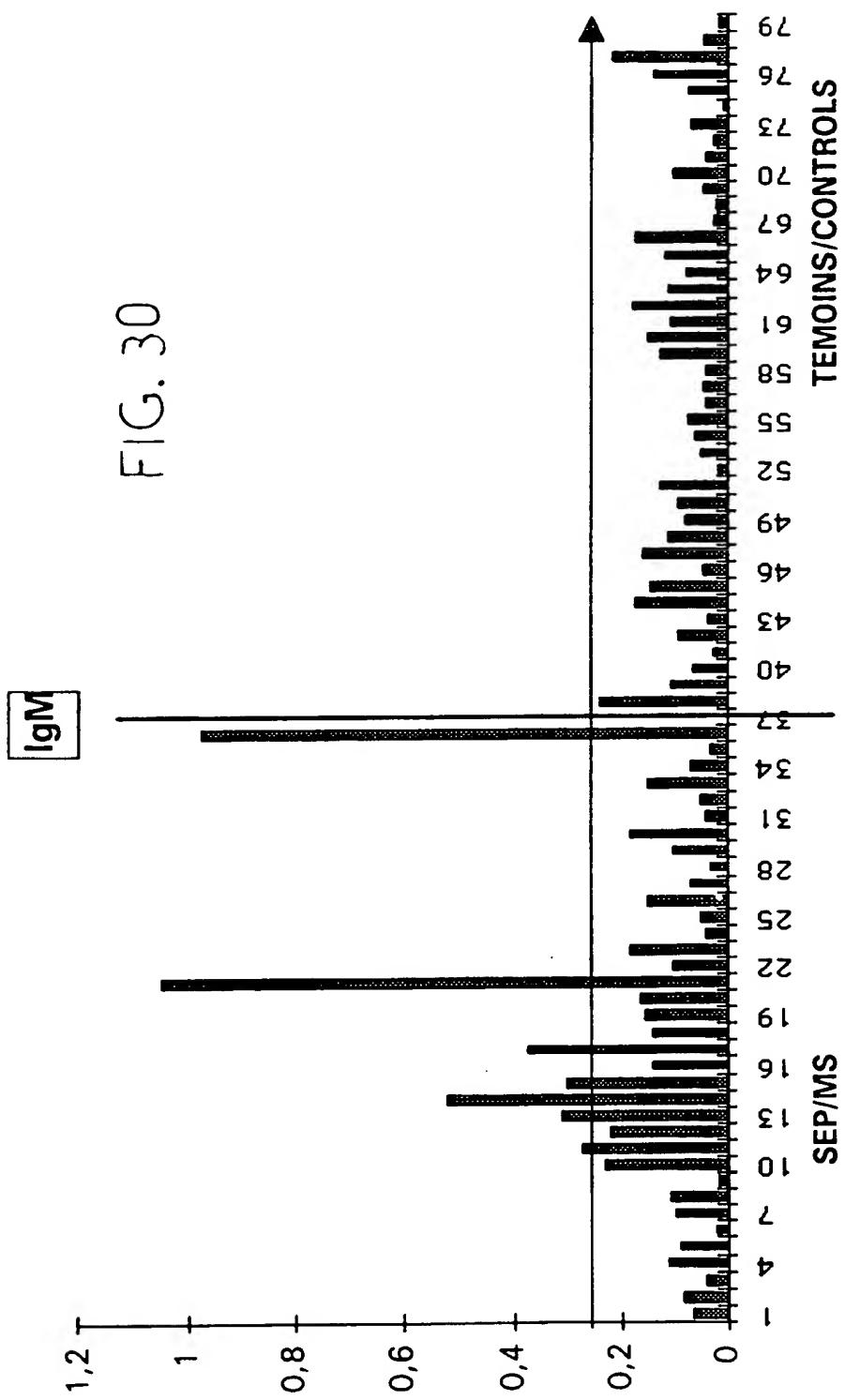
FIG. 29



2737500

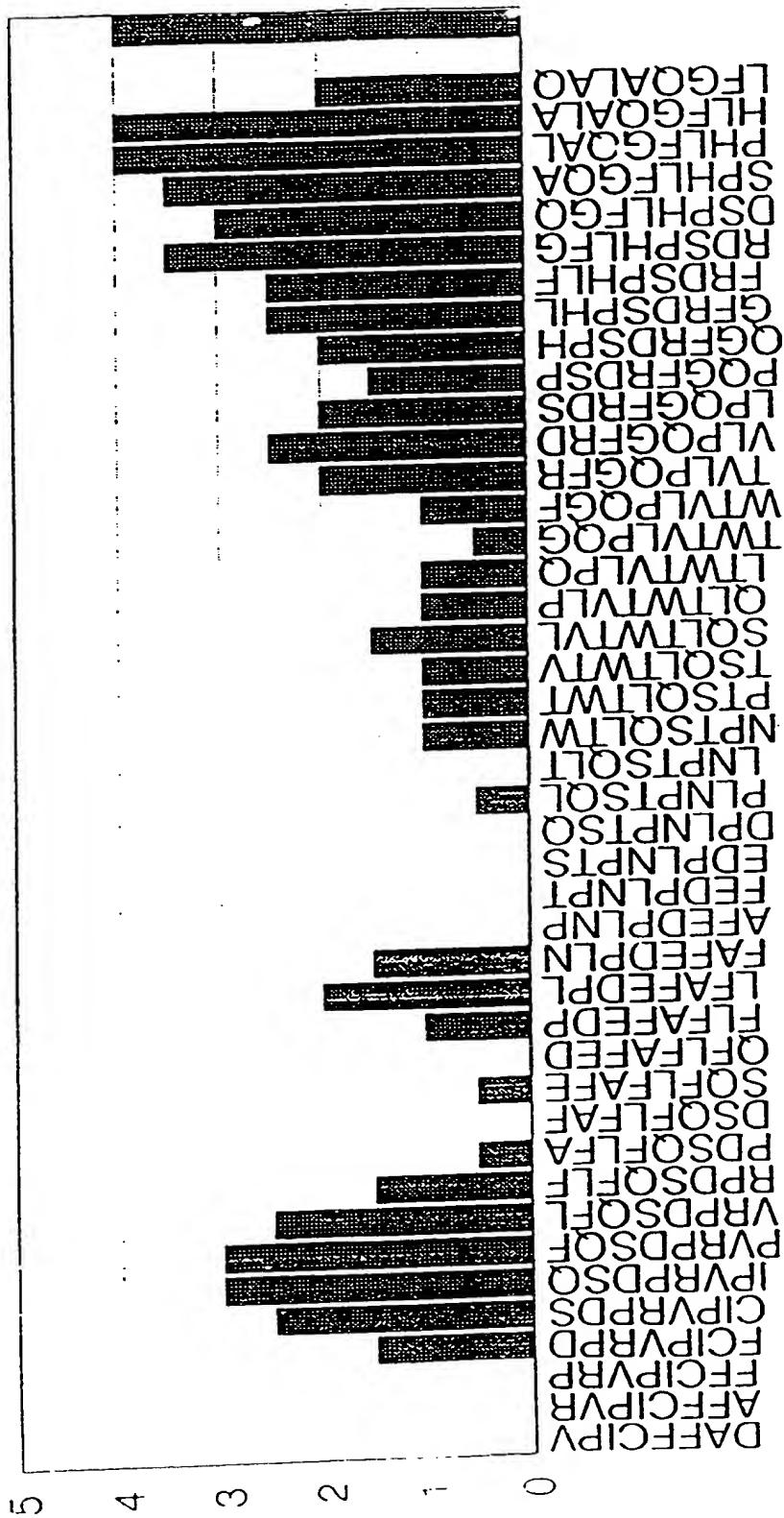
34/35

FIG. 30



56/5

FIG. 31



33/35

FIG. 32

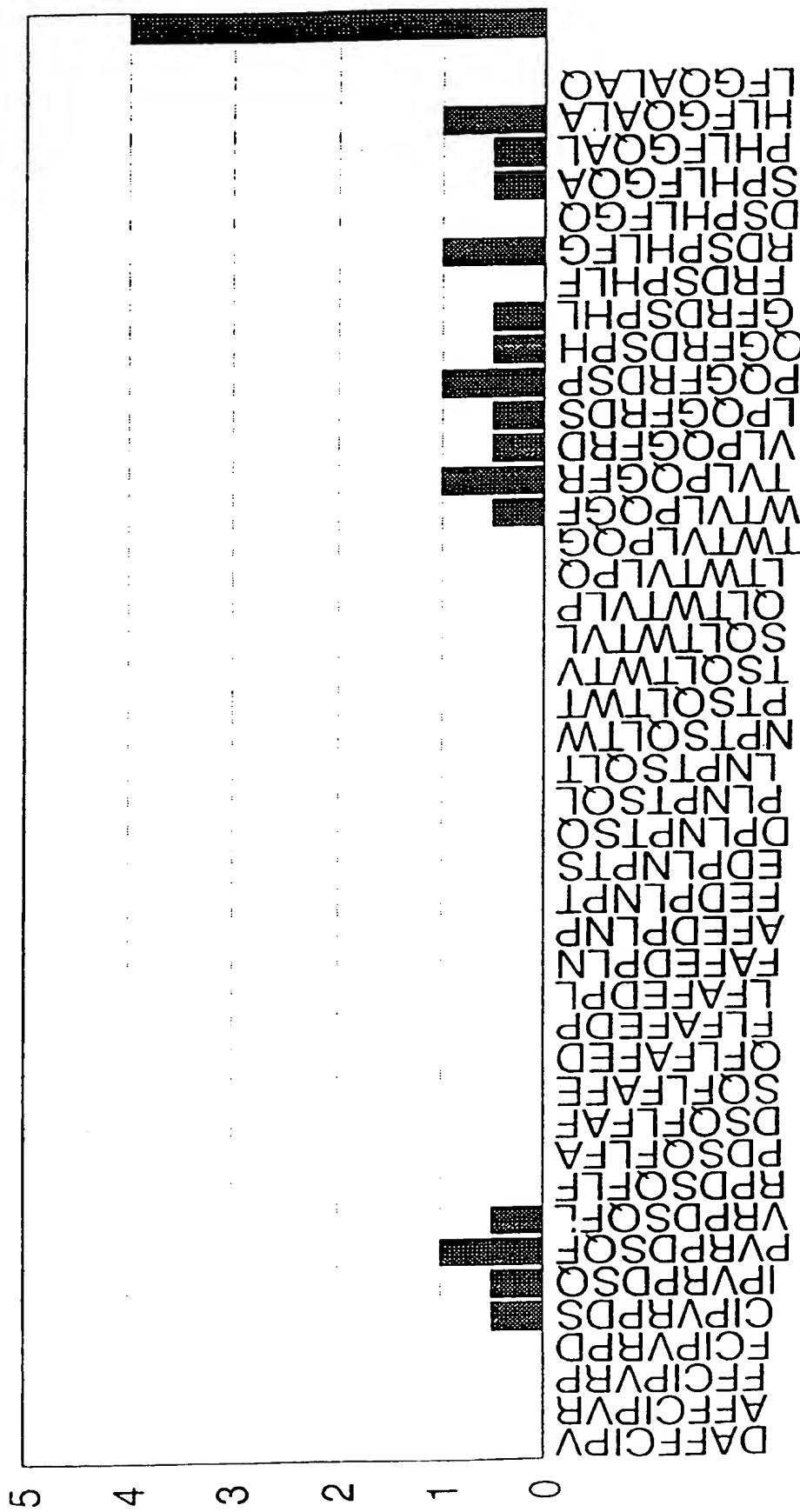
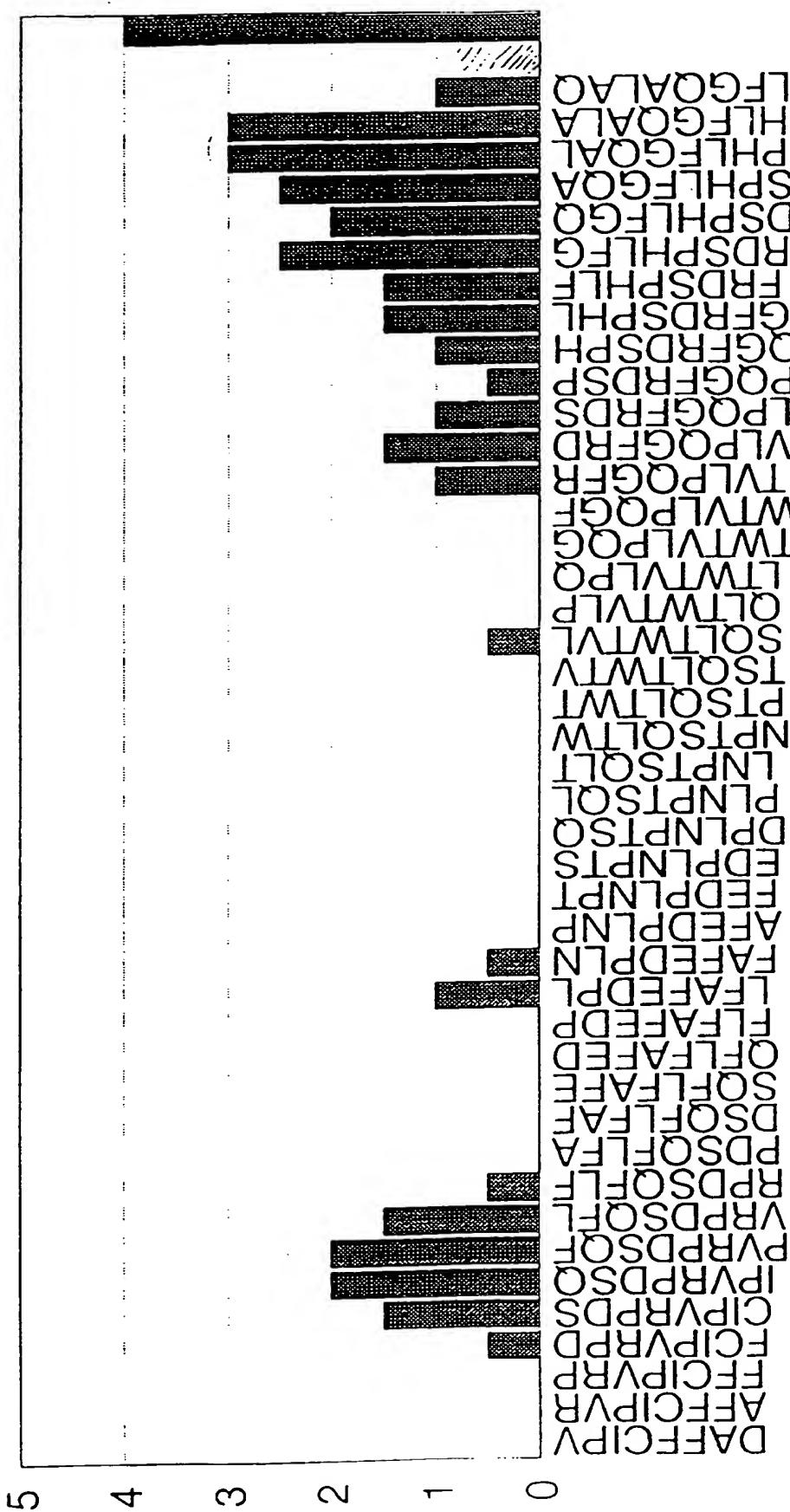


FIG. 33



2737500

35/35

FIG. 34

Cys-Ile-Pro-Val-Arg-Pro-Asp-Ser-Gln-Phe-Leu SEQ ID NO 41

Val-Leu-Pro-Gln-Gly-Phe-Arg-Asp-Ser-Pro-His-Leu-Phe-Gly-
Gln-Ala-Leu-Ala SEQ ID NO 42

Leu-Phe-Ala-Phe-Glu-Asp-Pro-Leu SEQ ID NO 43
Phe-Ala-Phe-Glu-Asp-Pro-Leu-Asn SEQ ID NO 44

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche2737500
N° d'enregistrement
nationalFA 516852
FR 9509643

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie		
A	WO-A-94 28138 (UNIVERSITY COLLEGE LONDON) 8 Décembre 1994 * page 1, ligne 25 - page 3, ligne 5 * ---	1-25
A	RESEARCH IN VIROLOGY, vol. 143, no. 5, 1992, pages 337-350, XP000569296 H. PERRON ET AL.: "In vitro transmission and antigenicity of a retrovirus isolated from a multiple sclerosis patient" * page 338, colonne de gauche, alinéa 1 - alinéa 3 * * page 342, colonne de droite, alinéa 2 - page 345, colonne de droite, alinéa 1 * * page 346, colonne de droite, alinéa 2 - page 347, colonne de gauche, alinéa 1 * * page 348, colonne de gauche, alinéa 2 * ---	13-18
A	LANCET THE, vol. 337, 6 Avril 1991, LONDON GB, pages 862-863, XP002001596 H. PERRON ET AL.: "Isolation of retrovirus from patients with multiple sclerosis" * page 862, colonne de gauche, alinéa 2 * * page 862, colonne de droite, alinéa 2 * -----	1-8, 12-19, 21-25
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CI.6)
		C07K C12N C12Q G01N A61K
1	Date d'achèvement de la recherche 25 Avril 1996	Examinateur Montero Lopez, B
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		